



فصلنامه علمی ژئوشیمی و فیزیولوژی گیاهان

نشریه علمی پژوهشی دانشگاه اصفهان
سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳

شماره چاپ: ۲۰۰۸-۸۲۶۴ - شماره آنلاین: ۲۳۲۴-۲۳۲۴

ژئوشیمی گیاهان ایران

علمی پژوهشی

سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳

Iranian Journal of Plant Biology

6th Year, No. 22
Winter 2014

P-ISSN: 2008-8264 E-ISSN: 2322-2204

همبستگی بین فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی در دو گونه تریب شیر (<i>Leontice armenica</i> L. و <i>Leontopetalum</i> L.) سیرا شوکت باری و زهرا جامعی	19-1
مطالعه اندام‌زایی گل در گونه‌فرفری (<i>Lycopodium excelsum</i> Mill.) سید محمدعلی غریب‌اللهی، سیمین شایم و محمدرضا دادپور	24-10
اثر تنش کمبود آب بر شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زبان (<i>Carum copticum</i>) رویا رمسوززاده، مهتاب شلفقت و شهاب‌نص	28-10
بازایی درون‌شسته برخی ژنوتیپ‌های ابرسی بوجانه (<i>Melicago sativa</i> L.) اثر فرسایش جنین‌زایی سادسی سهراب عالی، ناصر زارع، رسول آغشاری زکریا، پریسا شیخ‌شاهه، مصدق و مجید شکرپور	5-24
اثر متیل‌جاسموئات و فلکوات‌ها مختلف بون کز بر رنگ‌دهی‌های فوستری و مقدار پروتئین در گیاه تونون وراثه کوکر ۳۳۷	14-21
محراب‌های نوزاد، پلاول، خنت سرخه، اکیر نورستانیا، محسن زوزار و مهیار مشایقی	
تأثیر محلول پخش عنصر روی و هورمون اکسین بر تغییرات هورمونی و رشد گیاه ذرت (<i>Zea mays</i> L.) بهنام زنده، علی سروش‌زاده، قنبر قاشی و فواد مرادی	27-32
اثر رقم، سرما و پاک‌کوبوتراول بر رشد، محتوای کربوهیدرات و چراحت‌های سلول در گیاهچه لوبیا - ۱۰-۱۷ ریحانه صوابانی و الهام شریعت	
تأثیر سایکوسیل بر فعالیت‌های فوستری و اسانس گیاه زاریانه (<i>Feenictium vulgare</i>) تحت تنش خشکی پانگ عدلی‌بی و فاطمه توری	1-8-91
مطالعه واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جنم <i>Agrostis stolonifera</i> و <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. به نشن خشکی	119-1-8
اثر پلاستید نالوسی، عداد، جاتیزاده، محمود قاسم‌نژاد و محمدحسن علی بیگلری	
تأثیر اتانیت تریپلوئیدی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاه شاه‌دانه (<i>Cannabis sativa</i> L.) مهسا باری و حجت‌الله منصور	114-117
مطالعه و بررسی انگوی بیان ژن <i>AUX1</i> و تأثیر آن در ایجاد ریشه‌های نازک در لته‌های ریزون (<i>Olea europaea</i> L.) ویدم‌شاهی، امیر موسوی، فاینا آکگاد، سائوری پاندولفی، خدیجه رفوی، لوسیان بالدونی و سید مهدی حسینی مرتضی	118-117

Correlation between antioxidant activities and phenolic content of <i>Leontice armenica</i> and <i>L. leontopetalum</i> Samira Shokatyari and Rashid Jamei	1
A study on organogenesis in <i>Lycopodium excelsum</i> Mill. Seyed Mohammadali Khajedini, Somayeh Naghibi and Mohammad Reza Dadpour	2
Effect of water deficit on morphological and physiological parameters of <i>Carum copticum</i> Roya Razavizadeh, Mahdieh Shafeghat and Shabla Najafi	3
In vitro regeneration of some Iranian alfalfa (<i>Melicago sativa</i> L.) genotypes via somatic embryogenesis Sohrab Abedi, Nasser Zare, Rasoul Asghari Zakaria, Purisa Sheikhradeh Moasaddgh and Majid Shakerpur	4
The effect of methyl jasmonate and different chloride concentrations on photosynthetic pigments and proline content in <i>Nicotiana glauca</i> L. cv. Cooker 347 Mohammad Reza Tizhoosh-Jalaly, Jannat Samad, Akbar Norastehnia, Mohsen Zavareh and Mahyar Moshaghghi	5
Effect of zinc (Zn) and auxin (IBA) foliar application on phytohormonal variation and growth of corn (<i>Zea mays</i> L.) Behnam Zandi, Ali Serooshzadeh, Fozayeh Ghanati and Foad Moradi	6
Effect of cultivar, cold and paclobutrazol on growth, chlorophyll content and cell membrane injury in <i>Phaseolus vulgaris</i> plantlet Rayhaneh Amoozghaei and Elham Sharaf	7
Effect of cycocel on photosynthetic activity and essential oil of fennel (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.) under drought stress Babak Andalibi and Fatemeh Nouri	8
The study of physiological and biochemical responses of <i>Agrostis stolonifera</i> and <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. under drought stress Ayoub Molaahmad Nalouisi, Abdollah Hatamzadeh, Mahmood Ghassemzadeh and Mohammad Hassan Allibiglouci	9
The effect of tetraploidy induction on morphology and anatomy characteristics of <i>Cannabis sativa</i> L. Mahsa Bageri and Hekimeh Mansouri	10
Identification and gene expression analysis of <i>AUX1</i> influencing adventitious root induction in olive cuttings (<i>Olea europaea</i> L.) Vahideh Hedayati, Amir Mousavi, Fiammetta Alagna, Saverio Pandolfi, Khadijeh Razavi, Luciana Baldoni and Seyed Mehdi Hosseini Mazrmani	11

الحمد لله
والصلاة والسلام
على محمد وآله
الطيبين الطاهرين

پیشینه‌های
معماری
علمی-پژوهشی

سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳

نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران بر اساس ابلاغیه شماره ۳/۱۱/۵۵۸ مورخ ۱۳۸۸/۰۳/۲۵ کمیسیون بررسی نشریات علمی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، دارای درجه علمی-پژوهشی و شماره استاندارد بین‌المللی ۸۲۴۶-۲۰۰۸ (نسخه چاپی) و شماره استاندارد بین‌المللی ۲۲۰۴-۲۳۲۲ (نسخه الکترونیک) از سازمان اسناد و کتابخانه ملی جمهوری اسلامی ایران می‌باشد.

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

متن کامل نشریه در پایگاه‌های اطلاع‌رسانی زیر نمایه می‌شود:

http://uijs.ui.ac.ir/ijpb	پایگاه اختصاصی نشریه
http://www.magiran.com	بانک اطلاعات نشریات کشور
http://www.isc.gov.ir	پایگاه استنادی علوم جهان اسلام
http://www.sid.ir	پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی
http://www.ebscohost.com	ابسکو: میزبان پایگاه‌های اطلاعاتی
http://ulrichsweb.serialssolutions.com	اولریخ: راهنمای بین‌المللی نشریات ادواری
http://journals.indexcopernicus.com	ایندکس کوپرنیکوس (فهرست مجلات برتر)
http://www.doaj.org	دوآج: فهرست مجلات پژوهشی با دسترسی آزاد
http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=VKeuzPkAAAAJ	گوگل پژوهشگر

چاپ و لیتوگرافی: انتشارات دانشگاه اصفهان

ناشر: دانشگاه اصفهان

چاپ: بهار ۱۳۹۴

نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران (علمی-پژوهشی)
سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه چاپی): ۸۲۶۴-۲۰۰۸
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه الکترونیک): ۲۲۰۴-۲۳۲۲

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

مدیر مسؤول: دکتر منصور شریعتی
استاد - دانشگاه اصفهان
سر دبیر: دکتر منصور شریعتی
استاد - دانشگاه اصفهان

اعضای هیأت تحریریه

دکتر علی اکبر احسانپور	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر محمدرضا رحیمی نژاد 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 و صفحه‌آرای تخصصی: فریبا هادیان
ناشر: انتشارات دانشگاه اصفهان

نشانی: اصفهان - خیابان هزار جریب - دانشگاه اصفهان - ساختمان کتابخانه مرکزی - معاونت پژوهش و فناوری - طبقه دوم
اداره چاپ، انتشارات و مجلات - کد پستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱ - دفتر نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران

نشانی پست الکترونیک: IJPB@ui.ac.ir
پایگاه اختصاصی نشریه: <http://uijs.ui.ac.ir/ijpb>
شماره تماس: +۹۸(۳۱)۳۷۹۳۴۲۵۵
شماره دورنگار: +۹۸(۳۱)۳۷۹۳۲۱۷۷

هدف

دانشگاه اصفهان با همکاری انجمن زیست‌شناسی ایران، به منظور انجام رسالت‌های علمی-پژوهشی و نشر آخرین دستاوردهای علمی پژوهشگران دانشگاه‌ها و مؤسسات علمی در زمینه زیست‌شناسی گیاهی، نشریه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران با عنوان انگلیسی **Iranian Journal of Plant Biology** را به صورت فصلنامه منتشر می‌نماید.

محورهای موضوعی نشریه

نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران، مقاله‌های اصیل در زمینه‌های مختلف زیست‌شناسی گیاهان آوندی و غیرآوندی و گیاهان میکروسکوپی (جلبک‌ها) شامل: فیزیولوژی گیاهی، سیستماتیک گیاهی، زیست‌ملکولی گیاهی، زیست‌سلولی گیاهی، رشد و نمو گیاهی، ژنتیک گیاهی، بوم‌شناسی گیاهی، آناتومی و ریخت‌شناسی گیاهی و زیست فناوری گیاهی را پس از داوری دقیق به صورت مقاله کامل (full paper) و مقاله کوتاه (short paper) به چاپ می‌رساند.

قوانین حق نشر

۱. مقالاتی که برای بررسی به این نشریه ارسال می‌گردد نباید قبلاً در جایی به چاپ رسیده باشد و یا همزمان به مجلات دیگر ارائه شده باشد. همچنین، نیاستی نتایج آن در گردهمایی‌ها ارائه شده باشد.
۲. مسؤولیت صحت مطالب مقاله بر عهده نویسنده مسؤول مقاله است.
۳. تعداد و ترتیب اسامی نگارندگان بر اساس توافق بین آنها و نویسنده مسؤول مقاله صورت می‌گیرد.
۴. عدم رعایت شیوه نگارش مقاله باعث عدم پذیرش یا کندی مراحل پذیرش مقاله خواهد شد.
۵. نشریه در پذیرش، رد و اصلاح مقاله بر اساس قوانین مصوب این نشریه عمل می‌نماید.
۶. مقاله‌های دریافت شده توسط دبیران و داوران متخصص بررسی می‌شود و پس از پذیرش علمی توسط هیأت تحریریه با رعایت نوبت به چاپ می‌رسد.

تدوین مقاله در یک نگاه

متن مقاله بایستی به زبان فارسی باشد، رعایت قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه است.

مقاله کامل (full paper) به ترتیب شامل: عنوان، نام نگارندگان، وابستگی سازمانی نگارندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، سپاسگزاری، منابع، Title، Author(s) Affiliation(s)، Author(s) Name(s) و Abstract و Key words باشد و حداکثر در ۱۵ صفحه در فرمت نهایی نشریه تنظیم شود.

مقاله کوتاه (short paper) کاملاً شبیه مقاله کامل است به طوری که دارای: عنوان، نام نگارندگان، وابستگی سازمانی نگارندگان، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، سپاسگزاری، منابع، Title، Author(s) Affiliation(s)، Author(s) Name(s) و Abstract و Key words است، با این تفاوت که بدون بخش‌بندی و حداکثر در ۴ صفحه تنظیم می‌شود.

تدوین مقاله با شرح جزئیات (رعایت ترتیب در متن)

فایل مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word در فرمت ذخیره 2003، در کاغذ A4، با حاشیه‌های ۳ سانتی‌متر از چهار سوی، فاصله خطوط ۱ (single) و به صورت یک ستونی تهیه شود.

عنوان: فارسی: 16 B Zar Bold، انگلیسی: 14 Times New Roman Bold

نام نگارندگان: فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده پس از نام نگارنده به صورت superscript

درج ستاره (*) برای نویسنده مسئول (Corresponding Author)

وابستگی سازمانی نگارندگان: فارسی: 10 B Zar و انگلیسی: 8 Times New Roman

درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده پیش از نشانی به صورت superscript

نشانی پست الکترونیک نگارنده مسئول: 10 Times New Roman

چکیده: فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

حداقل ۱۰۰ و حداکثر ۲۵۰ واژه، از به کار بردن واژه‌های اختصاری اجتناب شود.

واژه‌های کلیدی: حداکثر ۷ واژه مرتبط و مرتب شده بر اساس حروف الفبا

متن مقاله: به ترتیب شامل: مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی و سپاسگزاری است. فارسی: 13 B Zar، انگلیسی:

11 Times New Roman

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.

جدول‌ها

جدول‌ها به همراه توضیحات آنها در متن مقاله آورده شود.

شماره گذاری و توضیحات جدول‌ها به صورت بالانویس باشد. فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

فرمت جدول‌ها در بخش Text wrapping، به صورت None انتخاب شود.

جدول‌های طولانی به صورت جدولی یکپارچه طراحی شود.

شکل‌ها

شکل‌ها به همراه توضیحات آنها در متن مقاله آورده شود.

شماره گذاری و توضیحات شکل‌ها به صورت زیرنویس باشد. فارسی: 11 B Zar، انگلیسی: 9 Times New Roman

فرمت شکل‌ها در بخش Layout، به صورت In line with text انتخاب شود.

شکل‌ها از حالت گروه‌بندی (group) خارج شود و به صورت یکپارچه باشد.

شکل‌های چند قسمتی فقط با حروف انگلیسی بزرگ برجسته گذاری شوند.

شکل‌هایی که از جنس نمودار هستند به صورت دو بعدی، سیاه و سفید، بدون سایه، با بافت ساده و بدون خطوط افقی طراحی شوند.

شکل‌هایی که از جنس تصویر هستند به صورت دو بعدی، بدون سایه، با کیفیت بسیار بالا ارسال شوند.

زیرنویس شکل‌ها و بالانویس جدول‌ها به یکی از دو صورت زیر تنظیم شود:

مقادیر، میانگین ... تکرار $\pm SE$ (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 $\pm SE$ (یا StD یا انحراف معیار یا خطای معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P < XXX$ است.

منابع (بر اساس شیوه‌نامه انجمن روان‌شناسی آمریکا، APA)

منابع استفاده شده در سراسر مقاله فقط به زبان انگلیسی با سال میلادی باشد.

منابعی که در اصل فارسی زبان هستند، با درج عبارت (in Persian) در انتها مشخص شوند.

منابع استفاده شده در متن مقاله در چهار مورد با فهرست منابع کاملاً منطبق باشد: استفاده شدن یا نشدن در متن یا انتها، داشتن املا صحیح و یکسان، داشتن یا نداشتن همکار، یکسان بودن سال.

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

ابتدای جمله

Rezanejad و Majd (۲۰۱۲) با بررسی تکوین گل آذین، گل و گرده ...

Naqinezhad و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات فلورستیکی خود در منطقه ...

وسط جمله

بر اساس مشاهدات Nasibi (۲۰۱۱) در مورد اثر نیتروپروساید سدیم ...

نتایج به دست آمده از بررسی‌های Mousavi و همکاران (۲۰۱۳) بر روی پروتئین‌های گزارشگر ...

انتهای جمله (از قدیم به جدید)

(Nasibi, 2011; Naqinezhad et al., 2011; Rezanejad and Majd, 1999; Mousavi et al., 2013)

عبارت *et al* بایستی به صورت مورب باشد (به دلیل لاتین بودن).

منابع (references in list)

منابع بر اساس حروف الفبا مرتب شود و به اندازه ۵/۰ سانتی‌متر به صورت Hanging تورفتگی داشته باشد. 11 Times New Roman

استناد به مقاله (paper)

به ترتیب شامل: عنوان نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان مقاله، عنوان نشریه، شماره مجلد، شماره صفحات است (به علامت‌های جدا کننده ویرایشی توجه شود).

پیش از عنوان آخرین نویسنده، واژه ربط and استفاده شود (استفاده از & مجاز نیست).

برای استناد به مقاله‌هایی که هنوز چاپ نشده‌اند به جای سال، از عبارت (in press) استفاده شود.

عنوان مقاله با حروف کوچک نوشته شود، به استثنای نخستین حرف از: نخستین واژه، اسامی خاص و اسامی علمی.

عنوان نشریه به صورت کامل (نه مخفف) نوشته شود.

حروف نخستین عنوان نشریه به صورت بزرگ (capital) نوشته شود.

Gholipour, A. and Sonboli, A. (2013) Rediscovery of *Acorus calamus* (Acoraceae) in Iran. *Taxonomy and Biosystematics* 5(15): 113-116 (in Persian).

Hsien-Jung, C., Chin-Shu, H., Guan-Jhong, H., Te-Jin, C. and Yaw-Huei, L. (2013) NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium and reduced glutathione mitigate ethephon-mediated leaf senescence, H_2O_2 elevation and senescence-associated gene expression in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Plant Physiology* 170(17): 1471-1483.

استناد به کتاب (book)

با توجه به اینکه ترجمه اغلب کتاب‌ها بدون دریافت مجوز از نویسنده و ناشر اصلی انجام می‌شود، استفاده از آنها در مجامع بین‌المللی موجب بروز مشکلات عدیده‌ای می‌شود. لذا، استناد به ترجمه‌های فارسی مجاز نیست. در صورت نیاز، اصل کتاب تهیه، مطالعه و به آن ارجاع داده شود.

به ترتیب شامل: عنوان نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان کتاب، شماره ویرایش در صورت وجود، نام انتشارات، نام نخستین شهر محل انتشارات.

Ghahreman, A. and Attar, F. (1999) Biodiversity of plant species in Iran. Tehran University Press, Tehran (in Persian).

Taiz, L. and Zeiger, E. (2010) Plant physiology. 5th edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

استناد به بخشی از کتاب (chapter in book) به طوری که هر بخش دارای نویسنده جداگانه باشد:

به ترتیب شامل: عنوان نویسنده یا نویسندگان بخش، سال، عنوان بخش، استفاده از واژه In، عنوان اصلی کتاب، نام ویراستار اصلی، شماره ویرایش در صورت وجود، شماره صفحه آغاز و پایان بخش، نام انتشارات، نام نخستین شهر محل انتشارات. توضیح: اگر ویراستار اصلی (chief editor) یک نفر باشد، از Ed. و اگر بیش از یک نفر باشد (chief editors) از Eds. استفاده می‌شود.

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 DC.

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.

استناد به کتاب چند جلدی دارای ویراستار اصلی با تاریخ نشر چند ساله

Rechinger, K. H. (Ed.) (1963-1998) Flora Iranica. vols. 1-176. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

Townsend, C. C. and Guest, E. (1966-1985) Flora of Iraq. vols. 1-9. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.

استناد به یک جلد از کتاب چند جلدی دارای ویراستار اصلی

Podlech, D., Zarre, Sh. and Maassoumi, A. A. (2001) Papilionaceae IV, Astragalus II. In: Flora Iranica (Ed. Rechinger, K. H.) vol. 175. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

استناد به پایان‌نامه کارشناسی ارشد و رساله دکتری

به ترتیب شامل: نام نویسنده، سال، عنوان پایان‌نامه، مقطع تحصیلی، نام دانشگاه، نام شهر، نام کشور.

Barzehkar, Gh. (1995) Flora and plant communities with their distribution according to ecological properties in Noor Forest Park. MSc thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (in Persian).

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

استناد به Patent

به ترتیب شامل: نام نویسنده، سال، عنوان، نام کشور و شماره patent.

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

استناد به همایش (سمینار، سمپوزیوم، کنگره، میتینگ و ...)

به ترتیب شامل: نام نویسنده‌گان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، نام محل برگزاری، نام شهر، نام کشور.

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.

استناد به مقاله کامل همایش (سمینار، سمپوزیوم، کنگره، میتینگ و ...): **Proceedings**

به ترتیب شامل: نام نویسندگان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، نام محل برگزاری، نام شهر، نام کشور.

Mohsenzadeh, S. (1996) Study of nitrogen fertilizer time and amount on seed production and other characterizations of Sorghum. In: Proceeding of the 4th Iranian Congress of Agriculture and Plant Breeding, Isfahan, Iran (in Persian).

Somsap, V., Atkins, C. and Jones, M. G. K. (1993) Tissue culture for transformation of narrow- and broad-leaved lupins. In: Proceeding of the 33rd Annual General Meeting of Australian Society of Plant Physiologist, University of Western Australia, Perth, Australia.

استناد به منابع با پدیدآورنده سازمانی

Iran Meteorological Organization (2007) Statistical data of Gonabad synoptic station. Retrieved from <http://www.weather.ir>. On: 30 October 2007 (in Persian).

استناد به اینترنت

استناد به نشانی‌های اینترنتی تقریباً فاقد اعتبار است، به استثنای نشانی‌هایی که محتوای آنها به صورت " پایگاه داده " قابل استفاده است، مانند: IPNI و IPCN. در مواقعی که ناگزیر از استفاده محدود از آن باشد نام نویسنده، زمان چاپ و زمان استخراج از پایگاه درج گردد.

IPNI, The International Plant Names Index. Retrieved from <http://www.ipni.org>. On: 31 March 2012.

ISTA, International Seed Testing Association. Retrieved from <http://www.seedtest.org/en/home.html> On: 16 May 2013.

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.

Title: دقیقاً منطبق با عنوان فارسی مقاله باشد. 14 Times New Roman Bold

Author(s) Name(s): دقیقاً منطبق با نام نگارندگان فارسی باشد. 11 Times New Roman Bold

درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده پس از نام نگارنده به صورت superscript

درج ستاره (*) برای نویسنده مسؤول (Corresponding Author)

Author(s) Affiliation(s): دقیقاً منطبق با وابستگی سازمانی فارسی باشد. درج شماره مربوط به وابستگی سازمانی هر نگارنده

پیش از نشانی به صورت superscript 10 Times New Roman.

Email: 10 Times New Roman

Abstract: دقیقاً منطبق با چکیده فارسی باشد. 12 Times New Roman

Key words: دقیقاً منطبق با واژه‌های کلیدی فارسی باشد. 12 Times New Roman

ارسال مقاله

فایل مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word در فرمت ذخیره 2003 تنظیم و به همراه فایل پیش‌نیاز (copyright) توسط عضو هیأت علمی در پایگاه اختصاصی نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران به نشانی <http://uijs.ui.ac.ir/ijpb> ارسال گردد.

تماس با نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران

شماره تماس: +۹۸(۳۱)۳۷۹۳۴۲۵۵

دورنگار: +۹۸(۳۱)۳۷۹۳۲۱۷۷

نشانی پست الکترونیک: ijpb@ui.ac.ir

نشانی پایگاه: <http://uijs.ui.ac.ir/ijpb>

نشانی: اصفهان - خیابان هزار جریب - دانشگاه اصفهان - ساختمان کتابخانه مرکزی - طبقه دوم - اداره چاپ، انتشارات و مجلات -

دفتر نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران، کدپستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱

داوران این شماره (سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳)

اعضای محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها و مؤسسات پژوهشی کشور که در داوری و ارزیابی مقالات این شماره از نشریه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران همکاری داشته‌اند معرفی شده، از همکاری علمی آنها تقدیر می‌گردد:

دانشگاه اصفهان	دکتر علی اکبر احسانپور
دانشگاه زابل	دکتر صدیقه اسمعیل زاده بهابادی
دانشگاه شیراز	دکتر یحیی امام
دانشگاه شاهد	دکتر حشمت امیدی
دانشگاه گلستان	دکتر محمدباقر باقریه نجار
دانشگاه دامغان	دکتر مه‌ری بهنام‌نیا
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات فارس	دکتر مجتبی جعفری‌نیا
دانشگاه شهید مدنی آذربایجان	دکتر نادر چا‌پارزاده
دانشگاه شهید چمران اهواز	دکتر پرژک ذوفن
دانشگاه شیراز	دکتر هما رجایی
دانشگاه پیام نور مرکز نجف‌آباد	دکتر رؤیا رضوی‌زاده
دانشگاه شیراز	دکتر محمدجمال سحرخیز
دانشگاه شهرکرد	دکتر لیلا شبانی
دانشگاه شهید باهنر کرمان	دکتر حکیمه علمی
دانشگاه زنجان	دکتر بابک عندلیبی
دانشگاه سیستان و بلوچستان	دکتر علیرضا عینعلی
دانشگاه تربیت مدرس	دکتر فائزه قناتی
دانشگاه فردوسی مشهد	دکتر محمد کافی
دانشگاه شهید باهنر کرمان	دکتر بتول کرامت
دانشگاه الزهراء	دکتر مریم کشاورزی
دانشگاه الزهراء	دکتر خدیجه کیارستمی
دانشگاه لرستان	دکتر مریم مددکار حق‌جو
دانشگاه زنجان	دکتر الهه وطن‌خواه

نشریه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران
سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه چاپی): ۸۲۶۴-۲۰۰۸
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه الکترونیک): ۲۲۰۴-۲۳۲۲

فهرست مقالات

- همبستگی بین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی در دو گونه ترب شیر (*Leontice armeniaca*) و
(L. leontopetalum) ۱۴-۱
سمیرا شوکت یاری و رشید جامعی

- مطالعه اندام‌زایی گل در گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ۲۴-۱۵
سید محمدعلی خواجه‌الدینی، سمیه نقی‌لو و محمدرضا دادپور

- اثر تنش کمبود آب بر شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زنیان (*Carum copticum*) ۳۸-۲۵
رؤیا رضوی‌زاده، مهدیه شفق و شهلا نجفی

- باززایی درون شیشه برخی ژنوتیپ‌های ایرانی یونجه (*Medicago sativa* L.) از طریق جنین‌زایی بدنی
..... ۵۰-۳۹
سهراب عابدی، ناصر زارع، رسول اصغری زکریا، پریسا شیخ‌زاده مصدق و مجید شکرپور

- اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و مقدار پرولین در گیاه توتون وارسته
کوکر ۳۴۷ ۶۲-۵۱
محمدرضا تیزهوش جلالی، جنت سرمد، اکبر نورسته‌نیا، محسن زواره و مهیار مشتاقی

- تأثیر محلول‌پاشی عنصر روی و هورمون اکسین بر تغییرات هورمونی و رشد گیاه ذرت (*Zea mays* L.)
..... ۷۶-۶۳
بهنام زند، علی سروش‌زاده، فائزه قناتی و فؤاد مرادی

- اثر رقم، سرما و پاکلوبوترازول بر رشد، محتوای کلروفیل و جراحی غشای سلول در گیاهچه لویا ... ۹۰-۷۷
ریحانه عمواقایی و الهام شریعت

نشریه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران
سال ششم - شماره بیست و دوم - زمستان ۱۳۹۳
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه چاپی): ۸۲۶۴-۲۰۰۸
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه الکترونیک): ۲۲۰۴-۲۳۲۲

فهرست مقالات

- تأثیر سایکوسل بر فعالیت‌های فتوسنتزی و اسانس گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) تحت تنش خشکی
۱۰۴-۹۱
بابک عندلیبی و فاطمه نوری

- مطالعه واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چمن *Agrostis stolonifera* و *Festuca arundinacea* Schreb.
نسبت به تنش خشکی ۱۱۶-۱۰۵
ایوب ملااحمد نالوسی، عبدالله حاتم‌زاده، محمود قاسم‌نژاد و محمدحسن علی بیگلویی

- تأثیر القای تتراپلوئیدی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)
۱۲۶-۱۱۷
مهسا باقری و حکیمه منصوری

- مطالعه و بررسی الگوی بیان ژن *AUX1* و تأثیر آن در ایجاد ریشه‌های نابجا در قلمه‌های زیتون (*Olea europaea* L.)
۱۳۳-۱۲۷
وحیده هدایتی، امیر موسوی، فیامتا آلاگنا، ساوریو پاندولفی، خدیجه رضوی، لوسیانا بالدونی و سید مهدی حسینی مزینانی

همبستگی بین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنلی در دو گونه ترب شیر (*L. leontopetalum* و *Leontice armeniaca*)

سمیرا شوکت یاری و رشید جامعی *

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

چکیده

در پژوهش حاضر، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ‌های خشک و غدد زیرزمینی خشک و تازه *Leontice armeniaca* و *L. leontopetalum* اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در هر دو گونه محتوای فنل، فلاونوئید کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی در برگ‌ها از غدد زیرزمینی بیشتر و نیز در *L. leontopetalum* بیشتر از *L. armeniaca* بود. برگ و ریشه *L. leontopetalum* به ترتیب بیشترین و کمترین قدرت احیاکنندگی را نشان دادند. درصد خنثی‌سازی رادیکال برای *L. armeniaca* در هر دو اندام بیشتر از گونه دیگر بود. محتوای فنل و فلاونوئید کل و نیز فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در تمامی آزمایش‌ها در نمونه‌های خشک غدد زیرزمینی هر دو گونه بیشتر از نمونه‌های تازه بود. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین محتوای فنل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی (به ترتیب $r=0/895$ و $r=0/937$) و همچنین بین محتوای فلاونوئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی (به ترتیب $r=0/859$ و $r=0/996$) مشاهده شد ($P<0.01$). اما بین مقادیر این ترکیبات و فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید همبستگی معنی‌دار (به ترتیب $r=0/327$ و $r=0/266$) به دست نیامد. در مقایسه نمونه‌های خشک و تازه، افزایش محتوای ترکیبات فنلی به افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی و احیاکنندگی غدد زیرزمینی منجر شد اما با افزایش مقدار این ترکیبات، فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید افزایش نیافت. بنابراین، ترکیبات فنلی می‌توانند در قدرت احیاکنندگی و آنتی‌اکسیدانی هر دو گونه نقش داشته باشند. در حالی که فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید تنها مربوط به ترکیبات فنلی نیست. به نظر می‌رسد که این گیاه می‌تواند یکی از منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باشد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید، فنل، ترب شیر (*Leontice L.*)

مقدمه

به تعویق انداختن فرآیند پیری و پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، سرما خوردگی و بیماری‌های عصبی مثل آلزایمر دارد (Liu, 2004).

مطالعات متعدد نشان داده است که مصرف محصولات گیاهی نظیر میوه و سبزی نقش مهمی در

تحقیقات زیادی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است.

جنس *Leontice L.* متعلق به تیره شیرپنجه (Podophyllaceae) با نام فارسی ترب شیر گیاهی علفی چند ساله، بدون کرک، با غده‌های زیرزمینی، شاخه‌های افراشته، برگ‌های نسبتاً گوشتی، متنوب یا گاهی متقابل، طوقه‌ای یا ساقه‌ای است (Maroofi, 2007) و منبعی غنی از آلکالوئید است (Gresser et al., 1993) همچنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌کولین استرازی است (Kolak et al., 2011). مطالعات Kolak و همکاران (۲۰۱۱) وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* را نشان داده است. تحقیقات دیگر وجود فلاوون‌ها در برگ‌ها و ساقه‌های این گونه را نشان می‌دهد (Cubukeu and Yazagan, 1974). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به ویژگی‌های مختلفی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به: ژنوتیپ، شرایط محیطی، اقلیم، فصل رشد، موقعیت جغرافیایی، نوع خاک و عوامل دیگری نظیر شرایط نگهداری و روش‌های خشک شدن اشاره کرد (Madrau et al., 2009؛ Boateng et al., 2008). فرآیندهایی مانند خشک کردن، ذخیره‌سازی، قطعه کردن، بسته‌بندی و ... ممکن است محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد (Rodrigues et al., 2009؛ Pérez-Gregorio et al., 2011). تاکنون مطالعه‌ای در مورد اندازه‌گیری و مقایسه ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های خشک و تازه این گیاه با روش حاضر در ایران انجام نشده است. با توجه به اهمیت دارویی ترکیبات آنتی‌اکسیدان، مطالعه حاضر به بررسی میزان همبستگی بین فعالیت‌های

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیری هستند که در طول فرآیند اکسیداسیون در سیستم‌های زیستی تشکیل می‌شوند و باعث آسیب به مولکول‌های زیستی از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و DNA می‌شود (Farber, 1994). از مهم‌ترین تأثیرات تخریبی آنها پراکسیداسیون چربی و در نتیجه تخریب غشای سلولی است (Bast et al., 1991). مواد غذایی که حاوی مقادیر فراوان آنتی‌اکسیدان هستند برای سلامت انسان مفید هستند و بدن انسان را در برابر این آثار محافظت می‌کنند (Berger, 2006). مطالعات اخیر نشان داده است که پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، تریپن‌ها و انواع عصاره گیاهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند و برای حفظ سلامتی و حفاظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها مفید هستند (Jimoh et al., 2010). آنتی‌اکسیدان‌ها از عمل رادیکال‌های آزاد که موادی فعال و ویرانگر هستند جلوگیری و آنها را خنثی می‌سازند و به این ترتیب از یک سو باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شوند و از سوی دیگر از پیشرفت سرطان‌ها جلوگیری می‌کنند (Proteggente et al., 2002؛ Pham-Huy et al., 2008). مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها که خاصیت ضد پیری دارند و باعث حفظ سلامتی می‌شوند شامل ویتامین‌های C، E کاروتنوئیدها و پلی‌فنل‌ها هستند (Proteggente et al., 2002). مطالعات نشان داده است که مصرف میوه‌ها و سبزیجات موجب کاهش خطر بروز بیماری‌های مزمن نظیر سرطان، بیماری‌های تخریب سیستم عصبی نظیر پارکینسون و آلزایمر، التهاب و پیری پوست می‌شود (Ames, 1983). امروزه

صافی واتمن شماره یک صاف شد و پس از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰g، محلول رویی برای اندازه‌گیری‌ها استفاده شد. عصاره‌ها تا زمان آزمایش در فویل پیچیده شده، در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Syvacy and Sokmen, 2004).

تعیین محتوای فنل کل: محتوای فنل کل با استفاده از معرف فولین-سیوکالتنو اندازه‌گیری شد (Oki et al., 2002). بر اساس این روش، ۱ میلی‌لیتر از محلول فولین-سیوکالتنو به ۱ میلی‌لیتر از محلول نمونه اضافه گردید. پس از سه دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۱۰ درصد به آن اضافه شد. جذب مخلوط ۱ ساعت بعد در طول موج ۷۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis (مدل S2100، شرکت WPA، انگلستان) ثبت شد. محتوای فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید (GAE) بر گرم نمونه با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بیان شد.

تعیین محتوای فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئید کل با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد (Sakanaka et al., 2005). مقدار ۱ میلی‌لیتر عصاره گیاهی به بالن ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه منتقل گردید و ۰/۳ میلی‌لیتر نترات سدیم ۰/۰۵ به آن اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، ۰/۳ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد نیز به مخلوط اضافه گردید. پس از ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار به آن افزوده و با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب محلول بلافاصله در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. محتوای فلاونوئیدی بر حسب میلی‌گرم کاتچین بر گرم نمونه بیان گردید. کاتچین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

آنتی‌اکسیدان و محتوای فنلی غدد زیرزمینی تازه و خشک در برگ‌های دو گونه از جنس *Leontice* برداشته است.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه: در این تحقیق، غدد زیرزمینی و برگ‌های *L. leontopetalum* از اطراف سد قشلاق، ارتفاع ۱۵۰۰ متر و *L. armeniaca* از جاده قدیم ماموخ، ارتفاع ۲۰۰۰ متر هر دو واقع در شهرستان سنندج در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط گیاه‌شناسان هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع سنندج شناسایی و تأیید شد.

مواد شیمیایی: مواد شیمیایی و حلال‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت Merck آلمان با درصد خلوص بالا تهیه شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌های برگ در سایه و دمای اتاق خشک شدند. غدد زیرزمینی پس از شستشو با آب با هدف تهیه نمونه‌های خشک و تازه به دو گروه ۱ و ۲ تقسیم شدند. نمونه‌های گروه ۱، در دمای اتاق و تاریکی (متوسط دمای محیط ۳۰ درجه سانتیگراد) به مدت یک هفته خشک شدند. نمونه‌های گروه ۲ به قطعات کوچک تقسیم و توسط آسیاب همگن و برای عصاره‌گیری آماده شدند (Hossain et al., 2010).

عصاره‌گیری: همه نمونه‌های خشک و تازه (۱ گرم برگ، ۷ گرم غده زیرزمینی) بلافاصله با متانول (به ترتیب ۱۶ و ۲۸ میلی‌لیتر) به عنوان حلال به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر مغناطیسی با استفاده از مگنت و در دمای اتاق، عصاره‌گیری شدند. محلول حاصل با کاغذ

سانتریفیوژ گردید. سرانجام ۲/۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلرید فریک (۱ گرم بر لیتر) مخلوط شد و جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. بالاترین جذب، بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی را نشان می‌دهد.

تعیین درصد خنثی‌سازی رادیکال سوپر

اکسید: برای سنجش درصد خنثی‌سازی رادیکال آنیون سوپر اکسید، رادیکال‌های آنیون سوپر اکسید، به وسیله یک سیستم اتواکسیداسیون پیروگالول ایجاد شدند (Jing and Zhao, 1995). مقدار ۹ میلی لیتر از محلول بافر تریس-کلریدریک اسید (۵۰ میلی مول بر لیتر، اسیدیته=۸/۲) به لوله آزمایش اضافه شد و لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. ۴۰ میکرولیتر از محلول پیروگالول (۴۵ میلی مول بر لیتر پیروگالول در کلریدریک اسید ۱۰ میلی مول بر لیتر)، که قبلاً در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده بود، با استفاده از یک سرنگ میکرولیتری به قسمت بالایی لوله آزمایش تزریق و مخلوط شد. مخلوط به مدت سه دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و بلافاصله ۱ قطره آسکوربیک اسید ۱ مولار برای پایان دادن به واکنش به درون مخلوط چکانده شد. جذب مخلوط پس از ۵ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر به عنوان A_0 ثبت شد که A_0 سرعت اتواکسیداسیون پیروگالول را نشان می‌دهد. سرعت اتواکسیداسیون A_1 از همان روش بالا گرفته شد با این تفاوت که به بافر تریس ۲۰ میکرولیتر از عصاره افزوده شد. همزمان یک شاهد (بلانک) از مواد واکنش دهنده به عنوان A_2 در نظر گرفته شد. درصد خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید از

اندازه گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن

فریک (FRAP): اساس این روش بر کاهش کمپلکس تری پیریدیل تری آزین-فریک به شکل رنگی آن (ferrous) در حضور آنتی-اکسیدان‌ها است. به طور خلاصه، معرف (ferric reducing FRAP (antioxidant power) شامل: محلول TPTZ (۶،۴،۲-تری پیریدیل-S تری آزین) ۵ میلی لیتر (۱۰ میلی مول بر لیتر کلریدریک اسید ۴۰ میلی مول بر لیتر)، کلرید آهن ($FeCl_3$) ۵ میلی لیتر (۲۰ میلی مول بر لیتر) و بافر استات ۵۰ میلی لیتر (۰/۳ مول بر لیتر و اسیدیته ۳/۶) است که به صورت تازه آماده شده و تا ۳۷ درجه سانتیگراد حرارت داده شده است. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۳ میلی لیتر معرف FRAP مخلوط شد و جذب مخلوط واکنش پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب میکرومول Fe^{+2} بر گرم نمونه با استفاده از منحنی استاندارد $FeSO_4$ بیان شد (Benzie and Strain, 1996).

اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش

قدرت احیاکنندگی: توانایی عصاره‌ها برای کاهش آهن سه ظرفیتی با روش Yildirim و همکاران (۲۰۰۱) تعیین شد. مقدار ۱ میلی لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار، اسیدیته ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید پتاسیم ($K_3Fe(CN)_6$ ۱۰ گرم بر لیتر) مخلوط شد، پس از آن مخلوط در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (۱۰۰ گرم بر لیتر) افزوده و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰g

رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\text{رابطه ۱: } [A_0 - (A_1 - A_2) \times 100] / A_0$$

تحلیل داده‌ها: همه آزمایش‌ها در قالب سه تکرار انجام شد. نتایج به صورت مقادیر میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شد. تفاوت بین نمونه‌ها با آنالیز واریانس یک سویه (ANOVA) در سطح آماری $P < 0.05$ بررسی شد. همبستگی بین محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آهن کاهیده، قدرت کاهیدگی و خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ و آزمون پی‌رسون محاسبه گردید.

نتایج

محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت‌های

آنتی‌اکسیدانی: جدول ۱ محتوای فنل و فلاونوئید کل، توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک (FRAP)، قدرت احیاکنندگی و درصد خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید را در نمونه‌های گروه‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد. سنجش محتوای فنل و فلاونوئید کل نشان داد که مقدار این دو ماده در برگ‌های هر دو گونه بیشتر از غدد زیرزمینی است و بیشترین مقدار فنل و فلاونوئید در برگ و غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* مشاهده شد. بیشترین و کمترین محتوای فنل و فلاونوئید کل به ترتیب در برگ *L. leontopetalum* و غده زیرزمینی تازه *L. armeniaca* مشاهده شد (جدول ۱). معنی‌داری بین محتوای فنل همه نمونه‌ها دیده شد ($P < 0.05$) این امر در مورد محتوای فلاونوئید کل نیز صدق می‌کرد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک در برگ‌ها بیشتر از غدد زیرزمینی خشک بود که این حالت در هر

دو گونه مشهود بود. تفاوت معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک در تمام نمونه‌ها وجود داشت ($P < 0.05$). مقایسه نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن بر اساس آزمون یاد شده در برگ ($60.1/6 \pm 4/51$) و در غدد زیرزمینی خشک ($151/4 \pm 7/107$) میکرومول آهن بر گرم) هر دو متعلق به *L. leontopetalum* است (جدول ۱). قدرت احیاکنندگی در گونه *L. leontopetalum* در برگ‌ها بیشتر از غدد زیرزمینی خشک بود اما در *L. armeniaca* از نظر قدرت احیاکنندگی تفاوت معنی‌داری در برگ‌ها و غدد زیرزمینی وجود نداشت ($P < 0.05$). در مطالعه حاضر، برگ و ریشه *L. leontopetalum* به ترتیب بیشترین ($1/141$) و کمترین ($0/889$) قدرت احیاکنندگی را نشان دادند (جدول ۱).

درصد خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید در هر دو گونه در برگ‌ها بیشتر از اندام زیرزمینی خشک بود و همچنین درصد خنثی‌سازی در گونه *L. armeniaca* در هر دو اندام بیشتر از گونه دیگر بود. بیشترین میزان خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید در برگ *L. armeniaca* ($64/36 \pm 0/36$ درصد) و کمترین میزان در غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* ($27/89 \pm 0/105$ درصد) مشاهده شد (جدول ۱).

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در تمام آزمایش‌های انجام شده بین غدد زیرزمینی تازه و خشک شده در دمای اتاق، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). محتوای فنل و فلاونوئید کل در نمونه‌های خشک *L. leontopetalum* (به ترتیب $41/56$ میلی‌گرم گالیک اسید و $0/428$ میلی‌گرم کاتچین بر

از بیشترین به کمترین عبارت بود از: بیشترین و کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک به ترتیب در برگ *L. leontopetalum* و غده زیرزمینی تازه *L. armeniaca* مشاهده گردید.

یک گرم نمونه) بیشتر از نمونه خشک *L. armeniaca* (۲۹/۱۳ میلی‌گرم گالیک اسید و ۰/۲۵۹ میلی‌گرم کاتچین بر یک گرم نمونه) بود. در مطالعه حاضر، الگوی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک

جدول ۱- محتوای فنل و فلاونوئید کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک، قدرت احیاکنندگی و درصد خنثی‌سازی رادیکال‌های سوپر اکسید عصاره‌های متانولی غدد زیرزمینی خشک و تازه و برگ‌های خشک *L. leontopetalum* و *L. armeniaca*: مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SD است. حروف یکسان در هر ستون، بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است. a, b, c و d: حروف انگلیسی کوچک در هر ستون برای مقایسه غدد زیرزمینی خشک و برگ‌های خشک است (گروه ۱). A, B, C و D: حروف انگلیسی بزرگ در هر ستون برای مقایسه غدد زیرزمینی خشک و تازه است (گروه ۲).

گونه	اندام	محتوای فنل کل (میلی‌گرم بر گرم)	محتوای فلاونوئید کل (میلی‌گرم بر گرم)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک (میکرومول آهن بر گرم)	قدرت احیاکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر)	خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید (درصد)
<i>L. leontopetalum</i>	ریشه خشک	۴۱/۵۶±۰/۸۹cA	۰/۴۲±۰/۰۰۶cA	۱۵۱/۴±۷۱/۰۷cA	۰/۸۸۹±۰/۰۳۷bA	۲۷/۸۹±۰/۱۰۵dC
	ریشه تازه	۳۱/۳۲±۰/۴۴B	۰/۰۷±۰/۰۰C	۸۹/۸±۴/۸۴B	۰/۶۳±۰/۰۰B	۱۰/۱±۵/۲۸D
	برگ خشک	۱۷۱/۹۱±۱/۷۶۲a	۲/۶±۰/۰۲۹b	۶۰۱/۶±۲۴/۵۱a	۱/۱۴۶±۰/۰۵۵a	۵۴/۵±۰/۴۴c
<i>L. armeniaca</i>	ریشه خشک	۲۹/۱۳±۰/۶dC	۰/۲۵۹±۰/۱۰۳dB	۷۳/۸±۵/۳۳dC	۰/۹۱±۰/۰۰۶aA	۶۰/۱۸±۰/۵۹۶bA
	ریشه تازه	۲۳/۴±۶/۸۱D	۰/۰۳±۰/۰۰D	۲۶/۲±۰/۳۴D	۰/۶۹±۰/۰۰۱B	۵۲/۶۱±۸/۵۷B
	برگ خشک	۸۸/۴±۲/۵۶b	۱/۴۴±۰/۰۲۳a	۴۹۸/۴±۴۲/۶۸b	۰/۹۱۵±۰/۰۰۳b	۶۴/۳۶±۰/۳۶a

زیرزمینی تازه *L. leontopetalum* مشاهده گردید. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود همبستگی معنی‌دار بین محتوای فنل و فلاونوئید کل / ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی وجود دارد. جدول ۳ نشان می‌دهد که در مطالعه حاضر همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای فنل کل و فلاونوئید کل غدد زیرزمینی خشک و تازه با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی وجود دارد. در این مطالعه، ارتباط بین محتوای فنل و فلاونوئید کل با فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید یک همبستگی منفی غیرمعنی‌دار است بدین معنی که با افزایش محتوای فنلی و فلاونوئیدی ظرفیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید افزایش نیافت.

جدول ۱ نشان می‌دهد که در هر دو گونه مورد مطالعه قدرت احیاکنندگی عصاره‌های غدد زیرزمینی خشک شده به طرز معنی‌دار بیشتر از غدد زیرزمینی تازه است. قدرت احیاکنندگی نمونه‌های تازه و خشک *L. leontopetalum* به ترتیب ۰/۶۳۸ و ۰/۸۸۹ و *L. armeniaca* به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۹۱ بود. جدول ۱ نشان می‌دهد که نمونه‌های خشک درصد جذب رادیکال آزاد بالاتری نسبت به نمونه‌های تازه داشتند به بیان دیگر، توانایی نمونه‌ها برای جذب رادیکال‌های آزاد پس از خشک کردن افزایش یافت. فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید به ترتیب بیشترین به کمترین عبارت بود از: بیشترین و کمترین فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید به ترتیب در برگ *L. armeniaca* و غده

جدول ۲- همبستگی بین محتوای فنل کل با محتوای فلاونوئید کل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک قدرت احیاکنندگی و خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید در غدد زیرزمینی خشک و برگ‌های *L. leontopetalum* و *L. armeniaca*. * ضریب همبستگی معنی‌دار در سطح $P < 0.01$.

محتوای فنل کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک	قدرت احیاکنندگی	فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید
$r = 0.937^{**}$	$r = 0.895^{**}$	$r = 0.266$	
$r = 0.96^{**}$	$r = 0.859^{**}$	$r = 0.327$	

جدول ۳- همبستگی بین محتوای فنل کل با فلاونوئید کل با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک قدرت احیاکنندگی و خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید در نمونه‌های خشک و تازه غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* و *L. armeniaca*. * ضریب همبستگی معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ و $P < 0.01$ ** ضریب همبستگی معنی‌دار در سطح $P < 0.01$.

محتوای فنل کل	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک	قدرت احیاکنندگی	فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید
$r = 0.987^{**}$	$r = 0.584^*$	$r = -0.536$	
$r = 0.835^{**}$	$r = 0.898^{**}$	$r = -0.03$	

بحث

نشان داده است که پلی فنل‌هایی که قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند مسؤول بخش عمده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها هستند (Pourmorad *et al.*, 2006). در پژوهش حاضر، گیاه *Leontice* از خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که با مطالعات پیشین همخوانی دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی جنس *Leontice* می‌تواند در ارتباط با حضور ترکیبات آلکالوئیدی، فنلی، فلاونوئیدی (Kolak *et al.*, 2011) و فلاون‌ها (Cubukeu and Yazagan, 1974) در این گیاه باشد. بر اساس بررسی‌های Kolak و همکاران (۲۰۱۱) عصاره آبی غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* نسبت به عصاره‌های متانولی و آلکالوئیدی، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد. یکی از ترکیبات موجود در جنس *Leontice* ترکیبات فلاونوئیدی است و تحقیقات نشان داده است که ساقه و برگ *L. leontopetalum* حاوی ترکیبات narcissin و glucside-3-quercetin است (Cubukeu and Yazagan, 1974).

اغلب مطالعاتی که تاکنون پیرامون ترکیبات شیمیایی، خواص دارویی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در جنس *L. Leontice* انجام شده است، بر گونه *L. leontopetalum* متمرکز بوده است. بر اساس نتایج گزارش شده از تحقیقات مختلف مشخص شده است که بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهی برای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش‌های متفاوت نظیر ABTS، DPPH و FRAP همواره نتایج یکسان به دست نمی‌دهد. عواملی نظیر: نوع رادیکال، حلال و روش استخراج بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی تأثیر دارند (Cao and Prior, 1998; Jimoh *et al.*, 2010; Zheng and Wang, 2001). بنابراین، در پژوهش حاضر از دو یا سه روش در ارزیابی بهتر خواص عصاره‌ها استفاده شد. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش FRAP (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک) انجام شد. مطالعات

حضور ترکیبات احیاکننده، کمپلکس‌های فری سیانید به شکل Fe^{+2} احیا می‌شوند (Soares et al., 2009). همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین قدرت احیاکنندگی و محتوای فنل و فلاونوئید کل (به ترتیب ۰/۸۵۹، ۰/۸۹۵) همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.01$). در نتیجه، این احتمال وجود دارد که ترکیبات فنلی مسؤو و ویژگی‌های احیاکنندگی در گیاهان باشند. ترکیبات فنلی دارای قدرت احیاکنندگی هستند. به بیان دیگر، این ترکیبات با اهدا الکترون یا اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را می‌شکنند و با پیش‌سازهای پر اکسید واکنش داده، از تشکیل پر اکسید جلوگیری می‌کنند (Kumaran and Joel Karunakaran, 2007). بنابراین، برگ *L. leontopetalum* که بیشترین قدرت احیاکنندگی را دارد احتمالاً بیشترین میزان ترکیبات احیاکننده و پلی‌فنل‌ها را دارد. در این روش، جذب نوری نمونه‌ها رابطه مستقیمی با توان احیاکنندگی دارد یعنی جذب نوری بیشتر بیانگر خاصیت احیاکنندگی بیشتر است و بدون واحد اندازه‌گیری است. مطالعات نشان داد که بین محتوای ترکیبات فنلی و توان احیاکنندگی در گیاهانی نظیر بارهنگ و درمنه همبستگی مثبت وجود دارد و با افزایش محتوای ترکیبات فنلی قدرت احیاکنندگی افزایش می‌یابد. این ترکیبات می‌توانند مسؤو فعالیت احیاکنندگی عصاره‌های گیاهی باشند (Mirzaei et al., 2010; 2011). بر اساس گزارش‌های Gulcine و همکاران (۲۰۰۶) عصاره خام و مونودسموزوئیدهای غدد زیرزمینی *L. smirnowii* با افزایش محتوای فنلی قدرت احیاکنندگی بالایی نشان دادند. بر اساس مطالعات

Gulcine و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی غدد زیرزمینی *L. smirnowii* بیان کرده‌اند که عصاره خام و مونودسموزوئیدهای این گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. گزارش‌ها نشان دادند که در گیاهانی مانند: بارهنگ و عروسک پشت‌پرده (*Physalis alkekengi*) بین محتوای فنل و فلاونوئید و سنجش FRAP ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود دارد (Mirzaei et al., 2011; Hoshani et al., 2012).

بنابراین با توجه به ارتباط مستقیم و مثبت بین محتوای فنل و فلاونوئید کل و سنجش FRAP در جنس *Leontice* (جدول ۲)، احتمالاً توانایی آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP می‌تواند به این ترکیبات مرتبط شود. اغلب پلی‌فنل‌ها در بین ترکیبات فیتوشیمیایی آنتی‌اکسیدان به علت ویژگی کاهیدگی و عمل به دام انداختن رادیکال آزاد حایز اهمیت هستند (Deepa et al., 2007).

محتوای فنل و فلاونوئید کل و FRAP در برگ‌ها بیشتر از غدد زیرزمینی بود و این در مورد هر دو گونه معنی‌دار بود. تفاوت معنی‌داری در هر سه آزمایش بین تمام نمونه‌ها دیده شد ($P < 0.05$). وجود تفاوت معنی‌دار در دو اندام مختلف گیاه نشان داد که توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در اندام‌های مختلف متفاوت است. بدین ترتیب با توجه به محتوای ترکیبات و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌های استفاده شده در پژوهش حاضر، به منظور مقابله با اکسیدان‌های مختلف بافت مناسب می‌تواند استفاده شود.

برای سنجش قدرت احیاکنندگی، تبدیل Fe^{+3} به Fe^{+2} در حضور عصاره‌های متانولی اندازه‌گیری شد. در

فرآیند خشک کردن تأثیر شایان توجهی بر میزان ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی احیای آهن فریک، قدرت احیاکنندگی و فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید نمونه‌ها نشان داد. محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در تمامی آزمایش‌های انجام شده پس از خشک شدن، افزایش نشان داد (جدول ۱) این افزایش احتمالاً در ارتباط با محتوای رطوبت نمونه‌ها است. بافت‌های گیاهی ممکن است در حین خشک کردن شکننده‌تر شوند که به تجزیه سریع‌تر دیواره سلولی طی مراحل استخراج (آسیاب کردن و همگن‌سازی) منجر می‌شود. در نتیجه سلول می‌تواند ترکیبات فنلی بیشتری طی این مراحل به درون حلال آزاد کند. احتمال دیگر این است که چون آنزیم‌ها در نمونه‌های تازه هنوز فعال هستند، نمونه‌های تازه ممکن است ترکیبات آنتی‌اکسیدان را به علت تجزیه آنزیمی از دست بدهند (Hossain *et al.*, 2010). برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در نمونه‌های تازه ممکن است ناپایدار باشد یا توسط آنزیم‌ها تخریب شوند. بنابراین پیشنهاد می‌شود از نمونه‌های خشک برای استخراج استفاده شود. در نمونه‌های خشک آنزیم‌ها به علت کاهش مقدار آب، غیرفعال هستند، بنابراین مقدار ترکیبات فنلی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ها حفظ می‌شود (Suhajz, 2006). محتوای ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی شش جنس از تیره Larniaceae توسط Hossain و همکاران (۲۰۱۰) بررسی شد. بر اساس مشاهدات آنها خشک کردن نمونه‌های تازه، محتوای ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. مطالعات

Kolak و همکاران (۲۰۱۱) عصاره آبی، متانولی و آلکالوئیدی غدد زیرزمینی *L. leontopetalum* از نظر قدرت احیاکنندگی یون مس غیرفعال است که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همخوانی ندارد. این موضوع می‌تواند به علت تفاوت اقلیم، نوع خاک، ارتفاع محل رویش، روش‌های استخراج و اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌ها باشد (Cao and Prior, 1998).

در پژوهش حاضر، فعالیت رادیکال سوپر اکسید توسط عصاره متانولی با استفاده از سیستم اتواکسیداسیون پیروگالول بررسی شد. آنیون سوپر اکسید باعث تولید رادیکال‌های خطرناک و مضر هیدروکسیل و اکسیژن منفرد می‌شود که هر دوی این رادیکال‌ها در تنش اکسیداتیو شرکت می‌کنند. همچنین سوپر اکسید می‌تواند با نیتریک اسید واکنش داده و تشکیل پراکسی نیتريت را بنماید (Halliwell, 1997). درصد خنثی‌سازی رادیکال در هر دو گونه در برگ‌ها بیشتر از اندام زیرزمینی است و همچنین درصد خنثی‌سازی برای گونه *L. armeniaca* در هر دو اندام بیشتر از گونه دیگر است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین درصد خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید و محتوای فنل و فلاونوئید کل (به ترتیب ۰/۳۲۷، ۰/۲۶۶) همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.01$). از آنجا که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تنها به محتوای فنل و فلاونوئید عصاره بستگی ندارد، بایستی رابطه بین فعالیت خنثی‌سازی این رادیکال با محتوای سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نیز بررسی شود. میزان خنثی‌سازی رادیکال می‌تواند علاوه بر این ترکیبات، مربوط به سایر ترکیبات گیاهی نظیر آلکالوئیدها، کاروتنوئید، کلروفیل و غیره باشد (Pokorny, 2007).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید در برگ‌ها از غدد زیرزمینی بیشتر بود که در مورد در هر دو گونه معنی‌دار بود. بیشترین محتوای این ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گونه *L. leontopetalum* مشاهده شد. عصاره‌های این جنس در تمامی آزمایش‌ها سطوح مختلفی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند که این مسأله استفاده از آن در طب سنتی را توجیه می‌کند. بنابراین شاید این گیاه بتواند یکی از منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باشد. خشک کردن نمونه‌ها در هوای آزاد باعث افزایش محتوای فنل کل، فلاونوئید کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، قدرت کاهیدگی و فعالیت خنثی‌سازی رادیکال شد. ارتباط مثبت و معنی‌دار بین محتوای فنل کل با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت کاهیدگی نشان داد که ترکیبات فنلی می‌توانند نقش کلیدی در قدرت کاهیدگی و آنتی‌اکسیدانی هر دو گونه داشته باشند. هرچند این ترکیبات با فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید در این مطالعه ارتباطی نداشتند. فرآیند خشک کردن می‌تواند روشی سودمند برای افزایش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان باشد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر در آزمایشگاه بیوشیمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه انجام شده است. از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت‌های مالی و از سرکار خانم مهندس ندا فرناد و آقای یاسر بهرامی برای راهنمایی در انجام امور آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌شود.

نشان می‌دهد که عمل خشک کردن، میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی خرما را کاهش می‌دهد (Shahdadi et al., 2011).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که با افزایش ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی نیز افزایش می‌یابد. احتمالاً ترکیبات فنلی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها نقش مهمی دارند. برخی از مطالعات گذشته ارتباط قابل توجهی بین محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه‌جات و سبزیجات گزارش کرده‌اند (Velioglu et al., 1998). بر اساس جدول ۳ بین درصد خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید با محتوای فلاونوئیدی ($r = -0.03$) رابطه‌ای مشاهده نشد. به بیان دیگر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی فقط به ترکیبات فنلی مربوط نیست بلکه به سایر ترکیباتی که طی فرآیند خشک شدن تولید می‌شوند نیز مربوط است (Pokorny, 2007). بین فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید و محتوای فنل کل ($r = -0.536$) همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. این نشان می‌دهد که افزایش در محتوای ترکیبات فنلی نقشی در میزان خنثی‌سازی رادیکال سوپر اکسید ندارد. پلی‌فنل‌ها تنها عوامل خنثی‌کننده رادیکال‌ها در عصاره نیستند. طبق بررسی Kolak و همکاران (۲۰۱۱) و Hoshani و همکاران، (۲۰۱۲) خنثی‌سازی رادیکال‌ها می‌تواند توسط ترکیبات دیگر نظیر کاروتنوئید و آلکالوئید انجام شود. به هر حال، بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی این گیاه برای کاربردهای دارویی نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تر است.

جمع‌بندی

به طور خلاصه محتوای فنل کل، فلاونوئید کل،

منابع

- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.
- Bast, A., Haenen, G. R. and Doelman, C. J. (1991) Oxidants and antioxidants: state of the art. *American Journal of Medicine* 91(3c): 2S-13S.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Berger, M. M. (2006) Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. *Nutrition Clinique et Metabolisme* 20(1): 48-53.
- Boateng, J., Verghese, M., Walker, L. T. and Ogutu, S. (2008) Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). *LWT - Food Science and Technology* 41: 1541-1547.
- Cao, G. and Prior, R. L. (1998) Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44(6): 1309-1315.
- Cubukeu, B. and Yazagan, A. (1974) Isolation of isorhamntin-3-rutinoside (narcissin) and quercetin-3-glucoside from leaves and stems of *Leontice leontopetalum*. *Natural Products* 37: 537-538.
- Deepa, N., Kaura, Ch., Georgea, B., Singhb, B. and Kapoor, H. C. (2007) Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotyps during maturity. *LWT - Food Science and Technology* 40: 121-129.
- Farber, J. L. (1994) Mechanisms of cell injury by activated oxygen. *Environmental Health Perspectives* 102(10): 17-24.
- Gresser, G., Bachman, P., Wittet, L. and Czygan, F. C. (1993) Distribution and taxonomic significance of Quinolizidine alkaloids in *Leontice leontopetalum* and *L. ewersmannii* (Berberidaceae). *Journal of Biochemical Systematics and Ecology* 21(6/7): 679-685.
- Gulcine, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A. and Elias, R. (2006) Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine* 13(5): 343-351.
- Halliwell, B. (1997) Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews* 55(1): S44-S49.
- Hoshani, M., Mianabadi, M., Aghdasi, M. and Azim Mohseni, M. (2012) An investigation of antioxidant activity of *Physalis alkekengi* methanolic extracts in different phenological stages *Journal of Plant Biology* 14: 101-114 (in Persian).
- Hossain, M., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B. and Brunton, N. (2010) Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Larniaceae herbs. *Food Chemistry* 123 : 85-91.
- Jimoh, F. O., Adedapo, A. A., Afolayan, A. J. (2010) Assessing the polyphenolic, nutritive and biological activities of acetone, methanol and aqueous extracts of *Rumex sagittatus* Thunb. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4(9): 629-635.
- Jing, T. Y. and Zhao, X. Y. (1995) The improved pyrogallol method by using terminating agent for superoxide dismutase measurement. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 22: 84-86.
- Kolak, U., Habekirglu, I., Boga, M., Ozgokce, F., Unal, M., Choudhary, M. I. and Ulubelen, A. (2011) Phytochemical investigation of *Leontice leontopetalum* subsp. *ewersmannii* with antioxidant and anticholinestrse activities. *Records of Natural Products* 5(4): 309-311.

- Kumaran, A. and Joel Karunakaran, R. (2007) *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Science and Technology* 40: 344-352.
- Liu, R. H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134: 3479S-3485S.
- Madrau, M. A., Piscopo, A., Sanguinetti, A. M., Del Cargo, A., Poiana, M., Romeo, F. V. and Piga, A. (2009) Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *European Food Research and Technology* 228: 441-448.
- Maroofi, H. (2007) Podophyllaceae. In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) vol. 56. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.
- Mirzaei, A., Akbartabar, M., Sadeghi, H. and Sharifi, B. (2010) The Antioxidant activities and total phenolic of *Artemisia martima*, *Achillea millefolium* and *Matricaria recutica*. 15(3): 243-252 (in Persian).
- Mirzaei, A., Mohammadi, J., Mirzaei, N. and Mirzaei, M. (2011) The antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 3(1): 104-111 (in Persian).
- Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I. and Sato, T. (2002) Polymeric procyanidins as radical- scavenging components in red-hulled rice. *Agricultural and Food Chemistry* 50(26): 7524-7529.
- Pérez-Gregorio, M. R., Regueiro, J., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R. and Simal-Gándara, J. (2011) Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red anions and subsequent storage. *Food Control* 22: 1108-1113.
- Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2): 89-96.
- Pokorny, J. (2007) Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant?. *European Journal of Lipid Science and Technolgy* 109(6): 629-642.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. and Shahabimajd, N. (2006) Antioxidant activity, phenol and favonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5(11): 1142-1145.
- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., Van De Put, F., Dacombe, C., Rice-Evans, C. A. (2002) The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research* 36: 217-233.
- Rodrigues, A. S., Pérez-Gregorio, M. R., García-Falcón, M. S. and Simal-Gándara, J. (2009) Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs. *Food Research International* 42(9): 1331-1336.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. (2005) Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry* 89: 569-575.
- Shahdadi, F., Mirzaei, H., Maghsoudlou, Y., Ghorbani, M. and Daraei Garmakhany, A. (2011) Effect of drying process on the phenolic-compounds content and antioxidant activity of two varieties of date-palm fruit Kaluteh and Mazafati. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology* 3: 67-74 (in Persian).
- Soares, A. A., Souza, C. G. M., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., Costa, S. M. G. and Peralta, R. M. (2009) Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry* 112: 775-781.

- Suhaj, M. (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 531-537.
- Syvacy, A. and Sokmen, M. (2004) Seasonal change in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanine constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 44(3): 251-256.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits and vegetables and grain products. *Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 4083-4089.
- Zheng, W. and Wang, Y. S. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165-5170.

مطالعه اندام‌زایی گل در گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

سید محمدعلی خواجه‌الدینی^۱، سمیه نقی‌لو^۲ و محمدرضا دادپور^{۳*}

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه، میانه، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۳ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین گیاهان باغی و عضوی از تیره سیب‌زمینی است. با وجود اهمیت این گونه به عنوان یک مدل ژنتیکی، اطلاعات اندکی از روند نمو گل در این گونه در دسترس است. در مطالعه حاضر، اندام‌زایی گل در گوجه‌فرنگی توسط میکروسکوپ نوری بازتابشی مطالعه شد. گل‌ها پنج پر بودند و آغازش حلقه‌های گل با الگوی رو به محور و بدون همپوشانی صورت گرفت. آغازش اندام‌ها در هر یک از حلقه‌های کاسبرگ، گلبرگ و پرچم به ترتیب از الگوی مارپیچی، تک‌جهتی و دوجتهی تبعیت نمود. وقوع فراوان حالت‌های غیرطبیعی در جریان نمو گل قابل توجه است. افزایش تعداد اندام‌ها در مورد کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها، پرچم‌ها و پرچه‌ها مشاهده گردید. افزایش شمار اندام‌ها به ویژه در حلقه پرچمی در نتیجه شکافتگی آغازها رخ می‌دهد. بر اساس نتایج مطالعات پیشین، احتمالاً دمای پایین، عامل نمو غیرطبیعی گل‌های گوجه‌فرنگی بوده است.

واژه‌های کلیدی: اندام‌زایی، گوجه‌فرنگی، میکروسکوپ نوری بازتابشی، نمو غیرطبیعی

مقدمه

پرورش داده می‌شود و بخش مهمی از رژیم غذایی مردم بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد. نظر به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی، این گیاه موضوع تحقیق و پژوهش‌های بسیاری بوده است و در علم ژنتیک به عنوان یکی از گیاهان الگو شناخته می‌شود.

گل‌های گوجه‌فرنگی که در گل‌آذین جانبی گرزن یک‌سویه تجمع یافته‌اند، دارای ۵ کاسبرگ متناوب با ۵ گلبرگ و ۵ پرچم مقابل کاسبرگی هستند. مادگی

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* Mill. متعلق به تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) است که همچون بسیاری محصولات زراعی دیگر با آب و هوای گرمسیری سازش یافته است. این گیاه که بومی آمریکای جنوبی و مرکزی است، طی دوره استعماری اسپانیا به سایر نقاط جهان منتقل شده است. انواع مختلف این گیاه امروزه در سراسر جهان

(۲۰۰۳) ظهور آغازه اندام‌ها تا مرحله چهار کامل می‌شود و به دنبال آن تمایز اندام‌ها در مراحل بعدی رخ می‌دهد. برای نمونه، در مرحله ۹ فرآیند میوز در بساک‌ها آغاز می‌شود و آغاز تخمک تشکیل می‌گردد و مگاسپوروژنز در مرحله ۱۱ تا ۱۲ آغاز می‌شود. اگرچه این مطالعه تا حدی به روشن شدن وقایع نموی گل در این گونه منجر شده است، اما الگوهای نموی گل در این گونه هنوز به طور کامل شناسایی نشده است.

با توجه به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی و مطرح بودن آن به عنوان یک گیاه مدل ژنتیکی، اطلاعات کامل و دقیق از جنبه‌های مختلف نموی گل در این گیاه برای برای درک بهتر اساس ژنتیکی نموی گل ضروری است. در بررسی حاضر، جزئیات اندام‌زایی گل در گیاه گوجه‌فرنگی مطالعه شد و ضمن توصیف کامل نموی گل‌های گوجه‌فرنگی، موارد غیرطبیعی مشاهده شده در روند نمو اندام‌ها مورد بحث قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

برداشت نمونه از گیاهان کشت شده در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان، وابسته به دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز صورت گرفت. جوانه‌ها در اندازه‌ها و سنین مختلف جمع‌آوری و در FAA تثبیت شدند. پس از دوره ۲۴ ساعته تثبیت، آنگیری نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در غلظت‌های متوالی اتانول ۷۰ و سپس ۹۶ درصد انجام گرفت. با پایان آنگیری نمونه‌ها، رنگ‌آمیزی آنها با نیگروزین ۰/۵ درصد محلول در اتانول ۱۰۰ درصد صورت گرفت (Dadpour *et al.*, 2008). پس از آن، فلوس‌زدایی نمونه‌ها در زیر استرنئومیکروسکوپ Nikon SMZ1500 انجام گردید.

مشکل از ۲ برچه الحاق شده است که به خامه‌ای منفرد و کلاله؛ رزدار منتهی می‌شود. در گل‌های بالغ، گلبرگ‌ها و پرچم‌ها طویل‌تر از خامه هستند و بساک‌ها لوله‌ای را در اطراف خامه تشکیل می‌دهند (Ronse De Craene, 2010). با وجود اهمیت اقتصادی گل‌های این گونه، تاکنون مطالعات معدودی در مورد تکوین و نمو بخش‌های مختلف گل انجام شده است. مطالعات تکوینی گل آذین و گل امروزه جایگاه ویژه‌ای یافته است و دانشمندان متعدد بر لزوم گسترش این مطالعات به موازات مطالعات ریخت‌شناختی، تشریحی و مولکولی نموی گل تأکید ورزیده‌اند (Smyth, 2005). به کارگیری روش‌های جدید و ابداع وسایل و ابزار پیشرفته امکان بررسی دقیق‌تر وقایع ابتدایی تکوین را مهیا کرده و میدان عمل این علم به سرعت در حال توسعه است (Dadpour *et al.*, 2009; Gohari *et al.*, 2010; Barati *et al.*, 2012).

پژوهشگرانی که پیش از این گل‌های گوجه‌فرنگی را بررسی نموده‌اند، بیشتر روی گیاهان جهش یافته یا تحت تنش‌های محیطی و هورمونی متمرکز شده‌اند (Sawhney and Nester and Zeevaart, 1988; Rasmussen and Green, 1993; Bhadula, 1988). تنها بررسی شایان توجه در زمینه توصیف ریختی نموی گل‌های گوجه‌فرنگی توسط Brukhin و همکاران (۲۰۰۳) انجام شده است که به تقسیم فرآیند نموی گل به ۲۰ مرحله منجر گردیده است که در هر مرحله، تعدادی وقایع برجسته رخ می‌دهد. در بررسی آنها ریخت‌شناختی و سیتولوژی، روند زمانی نموی گل و ارتباط مراحل مختلف نمو با اندازه مریستم گل به عنوان پایه‌ای برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی آینده مد نظر قرار گرفته است. بر مبنای بررسی Brukhin و همکاران

شکمی و جانبی مریستم گل آغازش می‌یابند و با فاصله اندکی، گلبرگ پنجم در بخش پشتی ظاهر می‌شود (شکل ۱- E و F). در ادامه، اندام‌زایی گل با ظهور آغازه‌های پرچمی دنبال می‌شود که به تعداد ۵ عدد و به صورت متناوب با گلبرگ‌ها ظهور می‌یابند. الگوی دوجهتی در جریان تکوین پرچم‌ها قابل مشاهده است. با توجه به اندازه آغازه‌ها، آغازش پرچم‌های پشتی و شکمی به صورت همزمان اتفاق می‌افتد که با فاصله اندکی آغازه پرچم‌های جانبی نیز پدیدار می‌شود (شکل ۱- G). اندکی پس از ظهور آغازه پرچم‌ها، برچه‌ها به صورت دو برجستگی نابرابر و کم و بیش مورب در قسمت مرکزی مریستم گل نمایان می‌شوند (شکل ۱- H و I).

نمو اندام‌ها: کاسبرگ‌ها در جریان آغازش

اندام‌های داخلی رشد قابل توجهی یافته و توسط کرک‌ها احاطه می‌شوند (شکل ۲- A). الگوی کرک‌دار شدن کاسبرگ‌ها منطبق بر الگوی آغازش آنها است و با کاسبرگ پشتی آغاز می‌شود (شکل ۲- B). کاسه گل در جریان تمایز کاملاً توسط کرک‌های طویل پوشیده شده و سایر اندام‌ها را در بر می‌گیرد، به طوری که برای مشاهده آغازش اندام‌های داخلی باید آنها را حذف نمود.

گلبرگ‌ها رشد یافته و روی مریستم گل خمیده می‌شوند (شکل ۲- B). در این مرحله، بخش رأسی گلبرگ‌ها توسط کرک‌ها پوشیده شده است. با ادامه نمو، رشد بینابینی در قاعده گلبرگ‌های مجزا، به تشکیل جام گلی کوتاه منجر می‌گردد (شکل ۲- D). حاشیه‌های گلبرگ‌ها در این مرحله به هم می‌رسند و به حالت مماسی در کنار هم آرایش می‌یابند (شکل ۲- D).

آغازه پرچم‌ها به تدریج رشد یافته و طویل می‌شود

نمونه‌های آماده شده با بهره‌گیری از میکروسکوپ نوری بازتابشی Nikon E600D که دارای فیلتر بازتابشی زمینه تاریک و عدسی‌های چشمی کاتادیوپتربیک بود، بررسی شدند. بدین منظور، هر نمونه در ظرف مخصوص محتوی اتانول ۹۶ درصد که در بخش مرکزی آن سوزن ظریفی تعبیه شده بود، استقرار یافت. تصاویر خام دیجیتالی توسط دوربین Nikon DXM1200 با وضوح ۱۳ مگاپیکسل، از سطوح مختلف نمونه با وضوح متفاوت برداشت شد. لایه‌های تصویری برای بهبود عمق میدان و به دست آوردن تصویر نهایی با کیفیت مطلوب ادغام و فرآوری شد (Dadpour *et al.*, 2008).

نتایج

آغازش اندام‌ها: نخستین نشانه اندام‌زایی، پیدایش

آغازه‌های کاسبرگی در پیرامون مریستم گل است. نخستین کاسبرگ در سطح پشتی گل (در مجاورت برگه) پدیدار می‌شود (شکل ۱- A). اندکی پس از آن، آغازه دومین کاسبرگ در سطح شکمی (به سمت محور گل آذین) نمایان می‌گردد (شکل ۱- B). تشکیل کاسه گل با ظهور آغازه کاسبرگ‌های سوم و چهارم در بخش پشتی و جانبی مریستم گل دنبال می‌شود (شکل ۱- B) و در پایان، پیدایش آخرین آغازه کاسبرگی در بخش جانبی در مقابل کاسبرگ چهارم رخ می‌دهد (شکل ۱- C). بنابراین، آغازش کاسبرگ‌ها با الگوی مارپیچی انجام می‌گیرد. پس از این که کاسبرگ‌ها اندکی رشد یافت و آغازه گلی را احاطه نمودند (شکل ۱- D)، ۵ آغازه گلبرگ در بخش داخلی و در موقعیت متناوب با کاسبرگ‌ها آغازش می‌یابند (شکل ۱- E). چهار گلبرگ با توالی سریع در بخش

می‌دهد (شکل ۳-C و D).

بحث

بر اساس بررسی‌های انجام شده در گوجه‌فرنگی اندام‌های گل در توالی رو به محور تکوین می‌یابند. آغازش و نمو ماریپیچی کاسبرگ‌ها با خط تقارنی که از کاسبرگ اول می‌گذرد، به ایجاد تک تقارنی مورب در گل منجر می‌شود. اغلب گل‌های تیره Solanaceae چندتقارنی هستند و تک تقارنی مورب به ندرت در برخی گونه‌ها نظیر *Schizanthus* و *Salpiglossis* مشاهده می‌شود (Eichler, 1875; Knapp, 2002).

بر اساس نظر Knapp (۲۰۰۲) تک تقارنی چندین بار در تیره Solanaceae ایجاد شده است و اشکال متنوعی از آن بر چندین اندام یا بر یک اندام خاص تأثیر گذارده است. در *Salpiglossis* و جنس‌های خویشاوند، جام گل و نافه هر دو تک تقارنی هستند و در *Browallia* پرچم پشتی نابارور است.

جام گل در گوجه‌فرنگی مشتمل بر ۵ لوب گلبرگی برآمده روی جام گل است که با آرایش مماسی استقرار یافته‌اند. لوله‌های گلبرگی در تیره Solanaceae اغلب بسیار طویل و دارای لوب‌های کوتاه یا کوتاه با لوب‌های برگشته هستند که برای نمونه در *Solanum* با گرده افشانی مرتبط است. آرایش گلبرگ‌ها در گیاهان این تیره یک دو یک، پیچ‌خورده یا مماسی است (Ronse De Craene, 2010).

در گوجه‌فرنگی همچون اغلب گونه‌های تیره Solanaceae شمار پرچم‌ها ۵ عدد و نافه تک حلقه پرچمی (haplostemonous) است. پرچم‌ها در تیره Solanaceae می‌توانند غیر هم اندازه با یک پرچم کوتاه‌تر (مانند *Nicotiana*) یا با اندازه‌های متفاوت باشند. برای نمونه، در *Petunia* و *Physalis* پرچم

(شکل ۲-C). با اتساع بخش انتهایی آغازه‌های پرچمی، بساک‌ها شروع به تمایز می‌کنند (شکل ۲-E). بساک‌ها بن چسب هستند و میله پرچمی به قاعده بساک متصل است (شکل ۲-E). در گل‌های بالغ، پرچم‌ها دارای بساک‌های کشیده، طویل و میله‌های کوچک هستند (شکل ۲-F). در این مرحله، کرک‌ها در بخش جانبی و شکمی بساک‌ها تمایز می‌یابند و به واسطه گره شدن کرک‌های اپیدرمی بساک‌ها به هم متصل شده، یک لوله پرچمی را در اطراف خامه تشکیل می‌دهند (شکل ۲-F).

برچه‌ها که در مرحله آغازش مجزا هستند، در جریان نمو در امتداد حاشیه‌های مجاور ادغام می‌شوند. در ادامه، رشد و بلند شدن مادگی به تشکیل تخمدان دو برچه‌ای پیوسته برچه، خامه منفرد طویل و کلاله پرزدار منجر می‌گردد (شکل ۲-G). تخمک‌های متعدد در هر یک از خانه‌های تخمدان نمو می‌یابند (شکل ۲-G).

موارد غیر معمول در جریان تکوین گل: طی

بررسی روند تکوین گل مواردی از افزایش شمار اندام‌ها و موقعیت‌های غیر معمول آنها مشاهده گردید. این موارد که با فراوانی نسبتاً بالا (تا ۵۰ درصد نمونه‌های بررسی شده) رخ می‌دهند شامل افزایش تعداد کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها، پرچم‌ها و برچه‌ها تا ۶ عدد هستند (شکل ۳). تعداد پرچم‌ها و برچه‌ها گاه تا ۷ عدد نیز افزایش می‌یابد (شکل ۳-C، D و H). افزایش اندام‌ها در حلقه‌های مختلف می‌تواند به صورت همزمان یا مستقل از هم انجام گیرد. البته حالت دوم با فراوانی بیشتری مشاهده گردید. بر اساس اطلاعات به دست آمده افزایش شمار اندام‌ها به ویژه در حلقه پرچمی و مادگی در نتیجه شکافتگی آغازه‌ها رخ

جنینی در تخمک‌ها با مراحل ۱۴ تا ۱۸ مطابقت می‌نماید.

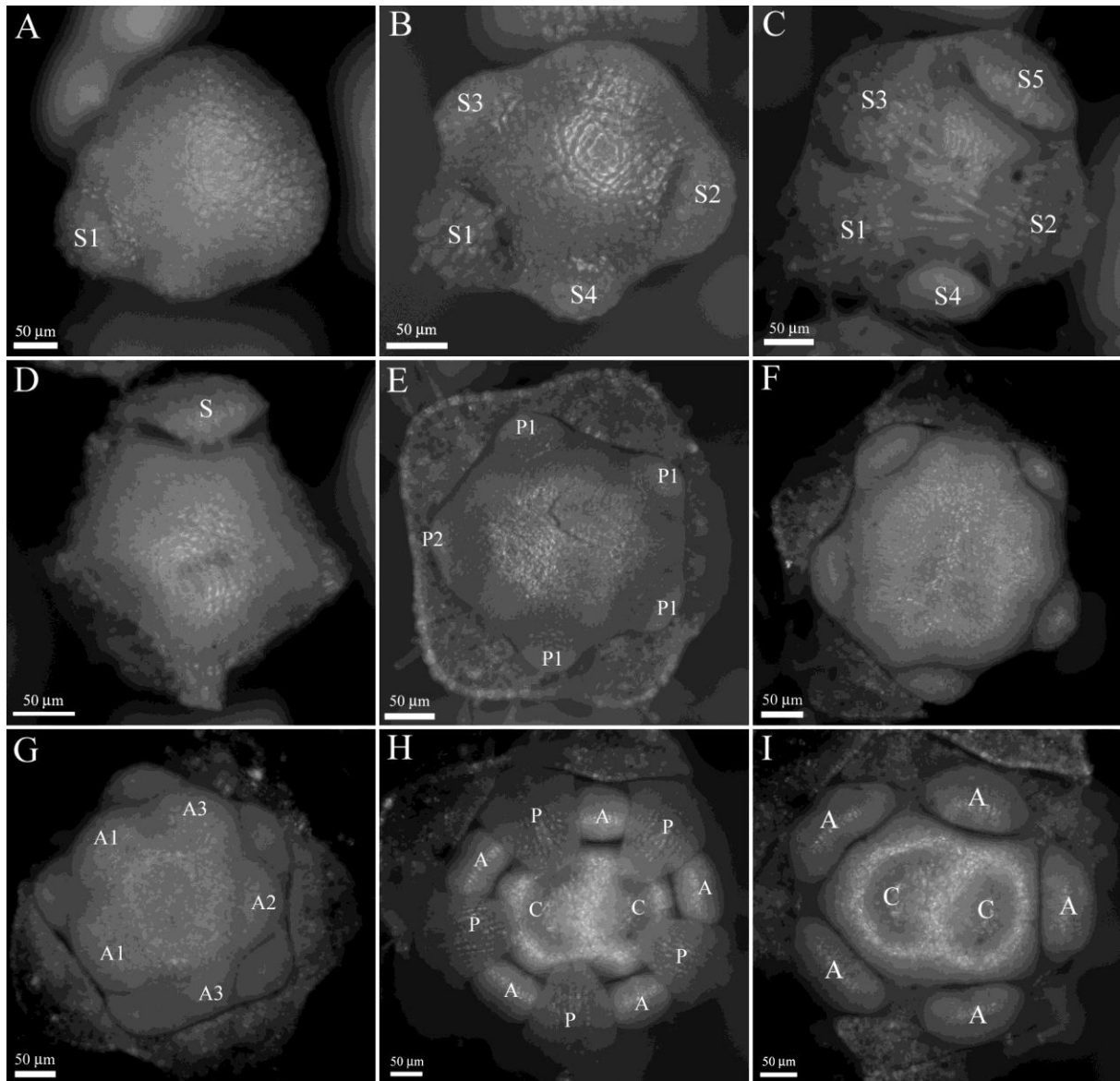
ویژگی جالب یافت شده در بررسی حاضر، مشاهده موارد متعدد افزایش اندام‌های گل در کنار حالت طبیعی پنج پری گل‌ها بود. افزایش تعداد اندام‌ها، به دنبال مضاعف شدن یا شکافتگی برخی آغازه‌های اصلی اتفاق افتاده است. گرچه انجام بررسی‌های بیشتر برای توجیه این پدیده مورد نیاز است، به نظر می‌رسد این موارد در نتیجه تأثیر عوامل محیطی از جمله سرما باشد. بررسی‌ها نشان داده است که مریستم گل پتانسیل تولید الگوهای ریخت‌شناسی مختلف در پاسخ به عوامل محیطی نظیر: درجه حرارت، فتوپریود و مواد تنظیم‌کننده رشد را دارد (Crozier and Thomas, 1993). بر اساس نتایج مطالعات پیشین، نمو گل و میوه گوجه‌فرنگی در زمان رشد گیاه در دمای پایین به شدت تغییر می‌یابد و به تغییر ماهیت و شمار اندام‌ها و تغییر در الگوی آغازش اندام‌ها منجر می‌گردد (Lozano *et al.*, 1998؛ Weiss and Egea-Cortines, 2009). تغییر ماهیت اندام‌ها اغلب به تبدیل پرچم‌ها و برچه‌ها به اندام‌های حد واسط منجر می‌شود. تغییر شکل کامل اندام‌ها نیز در مواردی در اندام‌های تولید مثلی گیاهان تحت تنش سرما دیده می‌شود. تغییر تعداد اندام‌ها که عمدتاً در حلقه‌های تولید مثلی این گیاهان دیده می‌شود، در مراحل بسیار ابتدایی نمو رخ می‌دهد و با افزایش معنی‌دار در اندازه مریستم گل مرتبط است. بررسی‌های انجام شده روی بیان ژن‌های گل‌دهی خانواده MADSbox در گوجه‌فرنگی‌های تحت تنش سرما و مقایسه آن با گیاهان طبیعی نشان داده است که بیان ژن‌های TAG1، TM، TM5 و

مقابل کاسبرگ ۱ کوتاه‌ترین، دو پرچم مجاور طویل‌ترین و دو پرچم شکمی دارای اندازه متوسط هستند. در *Schizanthus* تنها پرچم‌های متناوب با برچه‌ها بارور هستند (Eichler, 1875؛ Knapp, 2002). حالت مورب مادگی که در گوجه‌فرنگی مشاهده شده است، ویژگی شناخته شده در تیره Solanaceae است. مادگی در اعضای این تیره اغلب دارای ۲ و به ندرت ۵ برچه (مانند *Hicandra*) با تخمک‌های فراوان و تمکن محوری است (Ronse De Craene, 2010).

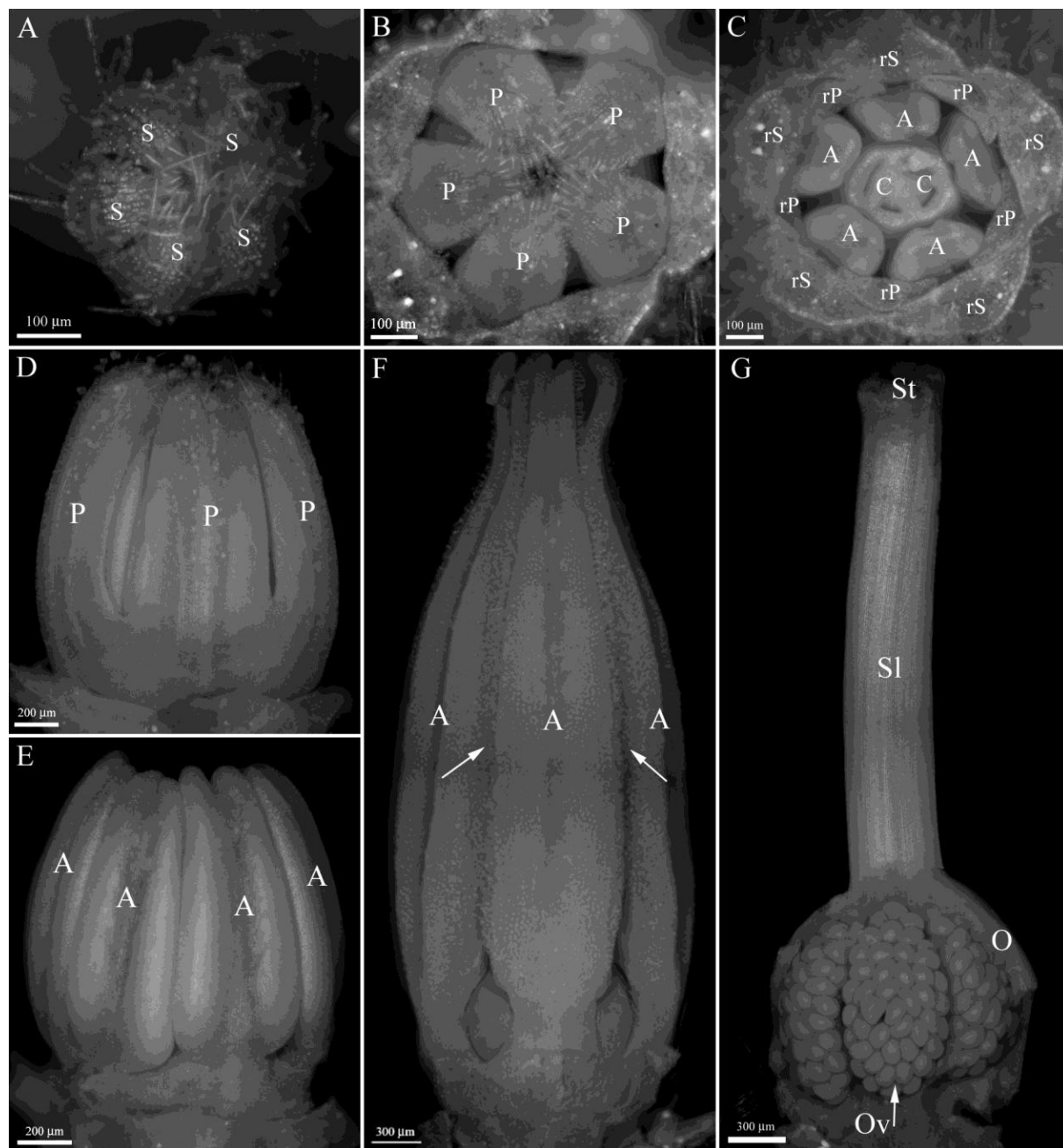
نتایج بررسی انجام شده روی الگوی آغازش اندام‌ها در گوجه‌فرنگی، در تطابق با پژوهش‌های پیشین، وجود فیلوتا کسی مارپیچی را در جریان آغازش کاسبرگ‌ها نشان داد (Sawhney and Greyson, 1972). با این وجود، ظهور تک‌جهتی و دو جهتی گلبرگ‌ها و پرچم‌ها مخالف با الگوی همزمان گزارش شده است (Brukhin *et al.*, 2003). آغازش اندام‌ها در حلقه‌های متوالی به دنبال هم و بدون همپوشانی رخ می‌دهد که با مراحل ۱ تا ۴ نمو گل معرفی شده توسط Brukhin و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی انجام شده توسط Brukhin و همکاران (۲۰۰۳) نمو گل در گوجه‌فرنگی به ۲۰ مرحله تقسیم شده است. این تقسیم‌بندی بر مبنای زمان آغازش اندام‌ها و به دنبال آن تمایز و تقسیمات سلولی بوده است. بر این اساس، ظهور آغازه کاسبرگ در مرحله ۱، ظهور آغازه گلبرگ در مرحله ۲، ظهور پرچم‌ها در مرحله ۳ و آغازش برچه در مرحله ۴ رخ می‌دهد. داده‌های بافت‌شناسی مربوط به مراحل بعدی نمو گل گوجه‌فرنگی نشان داد که گرده‌زایی و تمایز یابی بافت تپتوم با مرحله ۶ تا ۷، فرآیند میوز با مراحل ۸ تا ۱۰، آزادسازی میکروسپورها از تترادها در بساک با مرحله ۱۲ و زمان تمایز کیسه

شده نیز محتمل است که دوره‌ای از سرما را پشت سر گذارده‌اند. بررسی‌های تکمیلی در مورد اساس ژنتیکی فنوتیپ مشاهده شده در این گیاهان می‌تواند اثباتی بر این ادعا باشد.

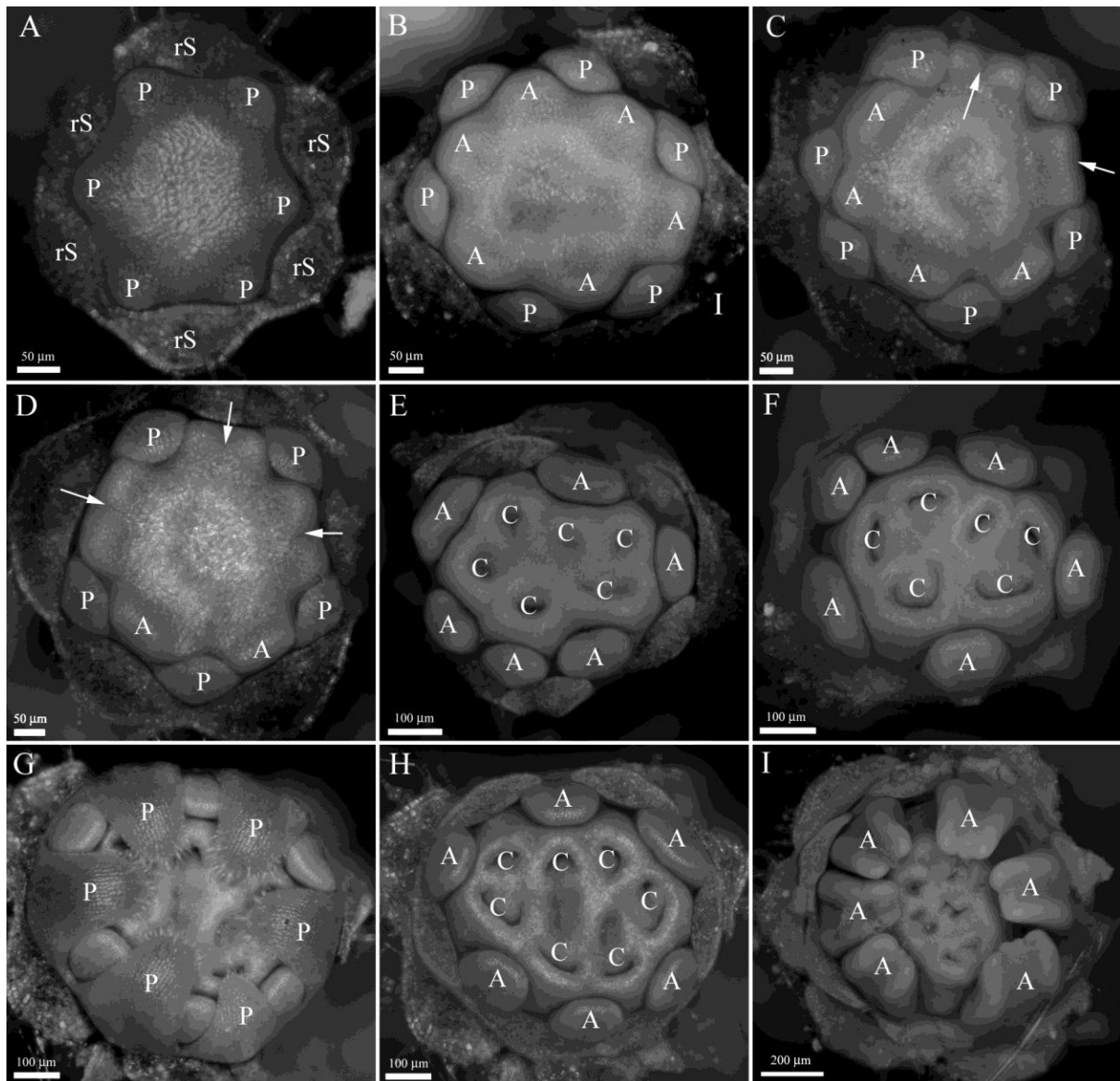
TM6 در اثر دمای پایین به شدت افزایش می‌یابد (Lozano *et al.* 1998). بنابراین، حالت‌های غیرطبیعی گل می‌تواند با تغییر بیان ژن‌های گل‌دهی مرتبط باشد. چنین حالتی در مورد گیاهان بررسی



شکل ۱- روند آغازش اندام‌های گل. (A) ظهور نخستین آغازه کاسبرگ در بخش پشتی؛ (B) تشکیل آغازه کاسبرگ‌های شکمی و جانبی؛ (C) پدیدار شدن آخرین آغازه کاسبرگ در بخش جانبی؛ (D) مریستم گل پس از حذف ۴ کاسبرگ بزرگتر؛ (E و F) پدیدار شدن آغازه گلبرگ‌ها در موقعیت متناوب با کاسبرگ‌ها؛ (G) پدیدار شدن آغازه‌های پرچمی با الگوی دوجبهتی؛ (H و I) کامل شدن مراحل اندام‌زایی با تشکیل دو آغازه برچه نابرابر در موقعیت مورب. A: پرچم، C: برچه، P: گلبرگ، S: کاسبرگ. بخش پشتی گل در سمت چپ قرار گرفته است. کاسبرگ‌ها در تصاویر D تا I و گلبرگ‌ها در شکل I حذف شده‌اند.



شکل ۲- روند نمو اندام‌های گل. (A) نمو نابرابر کاسبرگ‌ها و احاطه شدن آنها توسط کرک‌های طویل؛ (B) رشد گلبرگ‌ها و خمیده شدن آنها به سمت مرکز، کرک‌های نمو یافته در نوک گلبرگ‌ها قابل مشاهده هستند؛ (C) دید قطبی از مریستم گل پس از حذف کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها که رشد آغازی پرچم‌ها را نشان می‌دهد؛ (D) رشد گلبرگ‌ها و استقرار آنها با آرایش مماسی؛ (E) تمایز بساک و میله پرچمی؛ (F) بساک‌های کشیده و طویل و میله‌های کوچک پرچم‌ها در گل‌های بالغ. بساک‌ها به واسطه گره شدن کرک‌های موجود در بخش جانبی به یکدیگر اتصال می‌یابند؛ (G) مادگی تمایز یافته با خامه‌ای طویل، کلاله‌ای پرزدار و تخمک‌های متعدد در هر خانه تخمدان. A: پرچم، C: برچه، O: تخمدان، Ov: تخمک، P: گلبرگ، rP: گلبرگ حذف شده، S: کاسبرگ حذف شده، St: کلاله، SI: خامه.



شکل ۳- حالت‌های غیرمعمول نمو گل. (A) ظهور ۶ کاسبرگ و ۶ گلبرگ؛ (B) تشکیل ۶ گلبرگ و ۶ پرچم؛ (C و D) شکافتگی آغازی پرچم‌ها برای تشکیل آغاره‌های جدید (با فلش نشان داده شده است)؛ (E و F) افزایش پرچم‌ها و برچه‌ها به ۶ عدد؛ (G) افزایش همزمان تعداد گلبرگ‌ها، پرچم‌ها و برچه‌ها در یک گل؛ (H و I) گل‌هایی با ۶ پرچم و ۷ برچه. A: پرچم، C: برچه، P: گلبرگ، rS: کاسبرگ حذف شده. کاسبرگ‌ها در تمامی تصاویر و گلبرگ‌ها در تصاویر E، F، H و I حذف شده‌اند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه به انجام رسیده است.

از جناب آقای مهندس غلامرضا گوهری که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند تشکر می‌شود.

منابع

Barati, S., Dadpour, M. R. and Naghiloo, S. (2013) The study of floral ontogeny in *Glycyrrhiza glabra* L..

- Iranian Journal of Plant Biology 5(17): 52-41.
- Brukhin, V., Hernould, M., Gonzalez, N., Chevalier, C. and Mouras, A. (2003) Flower development schedule in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry). Sexual Plant Reproduction 15: 311-320.
- Crozier, T. S. and Thomas, J. F. (1993) Normal floral ontogeny and cool temperature-induced aberrant floral development in *Glycine max* (fabaceae). American Journal of Botany 80(4): 429-448.
- Dadpour, M. R., Naghiloo, S. and Gohari, G. R. (2009) The study of floral Ontogeny in *Phytolacca americana*. Iranian Journal of Plant Biology 1(1-2): 37-46.
- Dadpour, M. R., Grigorian, W., Nazemieh, A. and Valizadeh, M. (2008) Application of epi-illumination light microscopy for study of floral ontogeny in fruit trees. International Journal of Botany 4(1): 49-55.
- Eichler, A. W. (1875) Blu"thendiagramme. vol. 1. Wilhelm Engelmann, Leipzig (in German).
- Gohari, G. R., Naghiloo, S., Movafeghi, A. and Dadpour, M. R. (2010) The study of floral organogenesis in *Bougainvillea spectabilis* Willd. Iranian Journal of Plant Biology 2(2): 11-19.
- Khodaverdi, M., Naghiloo, S., Dadpour, M. R. and Movafeghi, A. (2012) Study of floral ontogeny in *Amorpha fruticosa* L. (Fabaceae). Iranian Journal of Plant Biology 4(14): 15-22.
- Knapp, S. (2002) Floral diversity and evolution in the Solanaceae. In: Developmental genetics and plant evolution (Eds. Cronk, Q. C. B., Bateman, R. M. and Hawkins, J. A.) 267-297. Taylor and Francis, London.
- Lozano, R., Angosto, T., Gomez, P., Payan, C., Capel, J., Huijser, P., Salinas, J. and Martínez-Zapater, J. M. (1998) Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-box genes. Plant Physiology 117: 91-100.
- Nester, J. E. and Zeevaart, J. A. D. (1988) Flower development in normal tomato and a gibberellin-deficient (ga-2) mutant. American Journal of Botany 75: 45-55.
- Rasmussen, N. and Green, P. B. (1993) Organogenesis in flowers of the homeotic green pistillate mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). American Journal of Botany 80: 805-813.
- Ronse De Craene, L. (2010) Floral diagrams: an aid to understanding flower morphology and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sawhney, V. K. and Bhadula, S. K. (1988) Microsporogenesis in the normal and male sterile stamenless-2 mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Canadian Journal of Botany 66: 2013-2021.
- Sawhney, V. K. and Greyson, R. I. (1972) On the initiation of the inflorescence and floral organs in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Canadian Journal of Botany 50: 1493-1495.
- Smyth, D. R. (2005) Morphogenesis of flowers our evolving view. The Plant Cell 17: 330-341.
- Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2009) Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. Journal of Applied Genetics 50(4): 311-319.

اثر تنش کمبود آب بر شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زنیان (*Carum copticum*)

رؤیا رضوی‌زاده^{۱*}، مهدیه شفق^۱ و شهلا نجفی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

چکیده

گیاه زنیان (*Carum copticum* L.) از مهم‌ترین گیاهان تیره Apiaceae است و مصارف دارویی فراوانی دارد. به منظور بررسی اثر تنش کم‌آبی بر رشد، عملکرد، انباشت متابولیت‌های سازگار (پرولین و کربوهیدرات) و مواد مؤثره گیاه زنیان آزمایشی تحت شرایط کنترل شده در گلخانه انجام شد. سطوح تنش کم‌آبی اعمال شده شامل: شاهد ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم)، ۷۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش متوسط)، ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) بود. در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، گیاه به مرحله بذردهی نرسید. همچنین، در پژوهش حاضر، اسانس دانه گیاهان تحت تنش سطوح کم‌آبی ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با روش تقطیر با آب به دست آمد و ترکیب‌های شیمیایی اسانس با روش GC/MS تحلیل شد. نتایج آماری نشان داد که تنش کم‌آبی اثر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد، عملکرد بذر، تجمع پرولین، تجمع کربوهیدرات، عملکرد و درصد اسانس داشته است. با افزایش تنش کم‌آبی ارتفاع بوته، تعداد شاخه جانبی، وزن خشک اندام رویشی و عملکرد بذر کاهش نشان داد. اما عملکرد اسانس، درصد اسانس، میزان پرولین و کربوهیدرات افزایش داشت. بیشترین میزان پرولین و کربوهیدرات در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) و بیشترین عملکرد اسانس و درصد اسانس در ۷۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش متوسط) مشاهده شد. تعداد ۲۱ ترکیب شیمیایی در هر دو اسانس بذر زنیان شناسایی شد که میزان ترکیب‌های اصلی اسانس تیمول، گاماترینین و پاراسیمین در هر تیمار تغییر یافته بود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، تنش خشکی، تیمول، پرولین، زنیان (*Carum copticum* L.)، کربوهیدرات

مقدمه

که تقریباً ۲۵ درصد از اراضی جهان را محدود می‌کند.

تنش خشکی همچنین بر تولیدات کشاورزی تأثیرگذار

است و باعث کاهش محصولات می‌شود (Khan et

خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد

گیاهان در سراسر جهان و شایع‌ترین تنش محیطی است

موجود در اسانس گیاه دارویی زنیان دارای اثر ضد باکتریایی است (Aberoomand Azar *et al.*, 2010).

تنش خشکی بر رشد، عملکرد و متابولیت‌های ثانویه در مورد همه گیاهان به طور یکسان عمل نمی‌کند، بلکه ضد و نقیض است. با توجه به این که امروزه نقش دفاعی متابولیت‌های ثانویه تقریباً پذیرفته شده است اما هنوز بررسی سازوکار تأثیر تنش‌های محیطی بر تولید این مواد تصویر پیچیده و پرابهامی پیش رو دارد. شواهد فراوانی نشان می‌دهد که در شرایط تنش، تولید برخی از این ترکیب‌ها تا چندین برابر افزایش می‌یابد، اما دلایل زیادی نیز وجود دارد که این تأثیر همیشگی نیست. در موارد زیادی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش مشاهده می‌شود (Misra and Khalid, 2000; Srivastava, 2004; Hasani *et al.*, 2004). تنش خشکی با کاهش تورژسانس و رشد سلول، کاهش جذب نور و ظرفیت کل فتوسنتزی گیاه به ویژه در ساقه و برگ‌ها، باعث کاهش رشد گیاه و همچنین به تأخیر انداختن جوانه‌زنی می‌شود (Hasani, 2006). Misra و همکاران (۲۰۰۴) مشاهده کردند که با کاهش مقدار آبیاری، ارتفاع بوته، قطر ساقه، سطح برگ، وزن تر و خشک ریشه گیاه ریحان کاهش پیدا کرد. Misra و Srivastava (۲۰۰۰) نیز مشاهده کردند که تنش آبی باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک و عملکرد اسانس بوته‌های نعناع می‌شود.

از سازوکارهای کارآمدی که گیاه در شرایط کم آبی از آن بهره می‌برد، تنظیم اسمزی است. تنظیم اسمزی پدیده‌ای فیزیولوژیک است که طی آن پتانسیل اسمزی بافت‌های تحت تنش در اثر انباشت گروهی از

(*al.*, 2010). تنش خشکی می‌تواند در اثر عوامل آب و هوایی متعدد که باعث کمبود آب در داخل گیاه می‌شود به وجود آید. طبیعت غیرمتحرک گیاهان سبب شده است که به طور مداوم در معرض انواع شرایط نامساعد محیطی (از جمله تنش‌های خشکی و شوری) قرار گیرند (Baghalian *et al.*, 2008). در چنین شرایطی اغلب اوقات دمای بالا و وضعیت نامناسب عناصر غذایی آثار خشکی را پیچیده‌تر می‌کند (Yadav and Bhathagar, 2001). با توجه به کمبود شدید منابع آب در آینده نزدیک، مدیریت منابع آب به منظور بهره‌وری و افزایش راندمان مصرف آب از اهمیت خاصی برخوردار است (Baghalian *et al.*, 2008).

گیاه زنیان با نام علمی *Carum copticum* از تیره چتریان (Apiaceae) جزو پیشرفته‌ترین گیاهان گل‌دار نهاندانه اولیه، علفی، یک‌ساله، بی‌کرک، ساقه ایستاده، برگ‌هایی با پهنک منقسم، بریدگی زیاد و نازک، با گل‌های سفید به صورت چتر مرکب، میوه کوچک و بیضوی است (Najafi, 2011). در طب سنتی، از زنیان به عنوان ضد نفخ، مسکن دردهای روماتیسمی و رفع ناراحتی‌های گوارشی استفاده می‌شود (Zargari, 1998). میوه گیاه دارای اسانسی است که مقدار نسبی آن بر حسب محل رویش تفاوت دارد. اسانس این گیاه با نام Ajowan oil شناخته می‌شود. این اسانس ظاهری بی‌رنگ یا مایل به قهوه‌ای و بویی شبیه تیمول دارد. ترکیبات آن تیمول، ترپین، کارواکرول، آلفا و بتا پینن، پاراسیمین و ... گزارش شده است (Aktuge and Karapikar, 1987). زنیان منبع بسیار غنی از ماده ضد عفونی کننده تیمول است (Zargari, 1998). تحقیقات متعددی پژوهشگران نشان داده است که تیمول

کاهش ماده خشک در گیاه پونه می‌شود.

تنش خشکی باعث تغییر در ترکیبات دارویی و معطر گیاهان دارویی می‌شود. مطالعات بسیاری نشان داده است که تعداد دانه‌های حاصل از گیاه طی تنش کاهش می‌یابد. نتایج بررسی Barnabas و همکاران (۲۰۰۷) در گیاه گشنیز و مطالعه Mohamed و همکاران (۲۰۰۲) در گیاه جعفری نشان داد که کاهش محصول دانه‌ای، به صورت کاهش تعداد دانه‌ها یا کاهش وزن آنها یا هر دو حالت است. همچنین تنش خشکی رسیدن دوره رویشی به دوره گلدهی را کاهش می‌دهد.

اثر تنش کم آبی تنها به رشد و عملکرد اسانس محدود نمی‌شود بلکه بر کیفیت اسانس نیز تأثیرگذار است. این نوع تنش درصد اسانس را در گیاهان معطر و دارویی افزایش می‌دهد. Khalid (۲۰۰۶) گزارش کرد که اعمال تنش خشکی در دو گونه ریحان شیرین و آمریکایی درصد روغن‌های ضروری و ترکیبات آن را افزایش می‌دهد؛ چون در موارد تنش اغلب متابولیت‌های بیشتری تولید می‌شود و این مواد مانع اکسیداسیون در سلول می‌شوند (Aliabadi et al., 2009). همچنین Rahmani و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که تنش خشکی تأثیر قابل توجهی بر درصد اسانس گل همیشه بهار داشت. نتایج آنها نشان داد که بالاترین درصد اسانس در شرایط خشک به دست آمده است.

اگرچه تاکنون پژوهش‌های وسیعی در رابطه با اثر تنش خشکی روی محصولات زراعی انجام شده است اما در زمینه واکنش گیاهان دارویی به شرایط تنش کم آبی بررسی‌های کمتری انجام شده است. در رابطه با پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی زینان نسبت به

مواد اسمزی در سلول‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه فشار تورژسانس سلول‌ها در حد مطلوبی نگهداری می‌شود. این مواد اسمزی عمدتاً شامل برخی از عناصر غذایی (نظیر: پتاسیم، سدیم و کلسیم)، برخی متابولیت‌ها نظیر: قندها (به ویژه مونوساکاریدها)، آمینو اسیدها (به ویژه پرولین) و اسیدهای آلی هستند (Serraj and Sinclair, 2002). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود همبستگی بین انباشت پرولین و قندهای محلول در گیاهانی که در معرض تنش کم آبی قرار می‌گیرند وجود دارد. به طور کلی، در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش کم آبی تجمع می‌یابد، تنظیم اسمزی بهتر انجام می‌شود (Salama et al., 2007).

Aliabadi و همکاران (۲۰۰۸) تجمع پرولین در شرایط تنش خشکی را در گیاه گشنیز مشاهده کردند. همچنین Bandurska و Jozwiak (۲۰۱۰) اثر تنش خشکی را در *Lolium perenne* بررسی کردند و نتیجه گرفتند که همزمان با کاهش محتوای نسبی آب، میزان پرولین افزایش می‌یابد.

اثر تنش خشکی بر گیاهان دارویی و معطر کمتر بررسی شده است. نتایج پژوهش‌های انجام شده بر برخی از گیاهان دارویی نشان داد که کمبود آب در مراحل رشد رویشی (پیش از مرحله گل‌دهی) موجب ایجاد گیاهانی با ارتفاع کوتاه و همچنین کوچک شدن سطح پهنک برگ مثلاً در گیاه بومادران می‌شود (Sharifi Ashoorabadi et al., 2005). کاهش دسترسی به آب باعث کاهش در اندازه گیاه *Calendula officinalis* شده است (Rahmani et al., 2008). همچنین در مطالعه Aliabadi و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است که رژیم کم آبی سبب

صورت یکسان آبیاری گردید و در نهایت تیمارهای مورد نظر در دو مرحله رشد رویشی و زایشی اجرا گردید. تیمارهای در نظر گرفته شده بر اساس درصد رطوبت خاک در حالت ظرفیت زراعی بودند. برای دستیابی به سطوح مختلف تنش خاکی از روش پرهیز از آبیاری استفاده شد. بدین صورت که گلدان‌ها پس از انجام آبیاری و رسیدن مقدار رطوبت خاک به سطح ظرفیت مزرعه، دیگر آبیاری نمی‌شدند. سپس، میزان رطوبت خاک چند بار اندازه‌گیری و پس از رسیدن رطوبت خاک به سطح رطوبتی تیمار مورد نظر، میزان آب لازم برای رسیدن رطوبت خاک گلدان از رابطه $V=PZA(FC-PWP)/100$ محاسبه گردید. در این رابطه V حجم آب آبیاری، P وزن مخصوص خاک، Z عمق توسعه ریشه، A مساحت واحد آزمایشی و PWP رطوبت خاک در نقطه پژمردگی دائم تعریف می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان رطوبت خاک و تعیین زمان آبیاری از دستگاه TDR (مدل TRYME، شرکت IMCO، ساخت آلمان) استفاده شد (Topp and Davies, 1985).

در پایان دوره رشد صفات مورفولوژیک نظیر: ارتفاع بوته، تعداد شاخه جانبی، تعداد چتر در هر بوته، وزن خشک اندام رویشی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین ابتدا

۰/۵ گرم از اندام هوایی هر تیمار برداشت گردید. سپس بافت گیاهی در هاون چینی کاملاً ساییده شد. پس از این مرحله، ۱۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۳ درصد به آن اضافه و محتوی هاون مخلوط و در نهایت با کاغذ صافی واتمن صاف گردید. به ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین (۱۲۵ میلی‌گرم نین هیدرین، ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار و ۳۰ میلی‌لیتر استیک

شرایط کم‌آبی اطلاعات اندکی در دسترس است. پژوهش حاضر با توجه به اهمیت مطالعه اثر تنش‌ها بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاهان دارویی، تأثیر تنش کم‌آبی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زنیان در شرایط گلخانه را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

برای بررسی تأثیر تنش کم‌آبی بر صفات کمی و کیفی گیاه زنیان، آزمایشی در قالب طرح تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل به اجرا درآمد. تیمارهای استفاده شده جهت اعمال تنش آبی عبارتند از: الف) شرایط ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم)؛ ب) شرایط ۷۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش متوسط)؛ ج) شرایط ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید).

در تحقیق حاضر، از بذر زنیان رقم بومی منطقه سیستان استفاده شد، در هر گلدان ۵ بذر کاشته شد. گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با مقداری شن درشت و سپس با مخلوط خاکی (ماسه، خاک باغچه و کود دامی پوسیده به نسبت حجمی ۱:۱:۱) پر شدند. پس از آماده‌سازی گلدان‌ها مخلوط بذر و ماسه و روی آن با مخلوط ماسه و کود دامی پوسیده به منظور جلوگیری از جابجایی بذر پوشانده شد. دمای گلخانه ۲۰ درجه سانتیگراد در روز و ۱۵ درجه در شب و میزان نور در حدود ۱۰۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰ لوکس تنظیم گردید. حدود یک هفته پس از کاشت، جوانه‌زنی بذر آغاز شد و گیاهچه‌ها شروع به رشد و نمو کردند. پس از چند مرحله تنک کردن، در نهایت، سه بوته در هر گلدان حفظ شد. تا رسیدن گیاهان به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری، گلدان‌ها به

بوته‌ها در زمانی که بذرها به رنگ سبز مایل به زرد در آمده بودند انجام شد. بوته‌ها جمع‌آوری و در سایه خشک گردید. سپس بذرها با کوبیده شدن از ساقه و مواد زاید دیگر جدا شدند. استخراج اسانس از بذر زنیان توسط دستگاه کلونجر (مدل British Pharmacopa، دارونامه بریتانیا) و با روش تقطیر با آب انجام گردید (Davazdah Emami *et al.*, 2010). پس از افزودن سولفات سدیم، برای جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس با دستگاه GC/MS در شرایط خنک و تاریک یخچال نگهداری شد. مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) به این شرح است: دستگاه GC (مدل HP-6890، شرکت Hewlett Packard، ساخت آمریکا)، درجه حرارت محل تزریق ۲۵۰ درجه سانتیگراد، برنامه‌ریزی حرارتی ۶۰-۲۲۰ درجه سانتیگراد، نوع ستون HP-5MS، گاز حامل هلیوم، سرعت جریان گاز ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و دستگاه MS (مدل HP-5973، شرکت Hewlett Packard، ساخت آمریکا) با انرژی یونیزاسیون 70eV بود.

شناسایی ترکیبات با توجه به الگوی خروج پیک‌ها، شاخص بازداری و تطبیق آنها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه کامپیوتری انجام شد. پس از تعیین درصد اسانس، عملکرد آن از طریق حاصلضرب عملکرد دانه و درصد اسانس به دست آمد (Kapoor *et al.*, 2004).

تحلیل آماری: از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح اطمینان ۵ درصد انجام گرفت.

اسید گلاسیال) اضافه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس، لوله‌های محتوی محلول حاصل در یخ قرار گرفت تا سرد شدند. پس از ایجاد تعادل با دمای محیط به لوله‌ها ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت مخلوط گردید. در پایان، مقدار پرولین در اندام هوایی با اسپکتروفتومتر (مدل U-100، شرکت Shimadzu، ساخت ژاپن) در طول موج ۵۲۰ نانومتر به دست آمد و بر اساس میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده تر محاسبه گردید (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری کربوهیدرات: ۰/۰۵ گرم بافت خشک شده از هر تیمار با ۳ میلی‌لیتر الکل ۸۰ درصد در هاون چینی کاملاً ساییده شد. همگنای حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد (مدل Z230AChermle، ساخت آلمان) و از محلول رویی برای سنجش قندهای محلول استفاده شد. به این ترتیب که ۱ میلی‌لیتر از عصاره حاوی کربوهیدرات‌های محلول در لوله آزمایش ریخته و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد فنل (۵ گرم فنل در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) افزوده و به خوبی مخلوط شدند (نمونه‌ها به نسبت ۱:۲ یا ۴:۱ رقیق شدند). در مرحله پایانی، ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ به هر لوله اضافه و به شدت مخلوط شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و مقادیر جذب نوری آنها در طول موج ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در پایان، مقدار قند بر حسب میکروگرم در ۱۰۰ گرم بافت خشک گیاه محاسبه گردید (Dubious *et al.*, 1956).

استخراج و اندازه‌گیری درصد اسانس: استخراج و اندازه‌گیری درصد اسانس، در پایان گل‌دهی برداشت

نتایج

اثر تنش کم آبی بر ارتفاع بوته: سطوح مختلف
تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر ارتفاع بوته داشت (جدول ۱). بیشترین ارتفاع در سطح ۹۰ درصد ظرفیت زراعی برابر با ۵۳/۶۶ و کمترین آن در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی برابر با ۳۱/۶۶ سانتی متر بود (جدول ۲).

اثر تنش کم آبی بر تعداد شاخه جانبی: سطوح مختلف
تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر تعداد شاخه‌های جانبی در بوته داشت (جدول ۱). بیشترین تعداد شاخه جانبی مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با ۶/۶۶ و کمترین مقدار مربوط به تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی با ۳/۳۳ شاخه جانبی بود. تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی با ۵/۳۳ شاخه جانبی اختلافی با تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی نداشت (جدول ۲).

اثر تنش کم آبی بر وزن خشک اندام رویشی:

سطوح مختلف تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر وزن خشک بوته داشت (جدول ۱). بیشترین میزان وزن خشک تک بوته مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با ۲۷/۶۸ و کمترین میزان مربوط به تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی با ۲۰/۹۵ گرم بود (جدول ۲).

اثر تنش کم آبی بر تعداد چتر: سطوح مختلف

تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر تعداد چتر در بوته داشت (جدول ۱). بیشترین تعداد چتر، مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با ۲۲/۳۳ و کمترین آن مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی با ۱۸/۳۳ چتر بود (جدول ۲). شایان ذکر است که در تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به علت کاهش شدید مقدار آب، رشد رویشی گیاه زنیان (اندام هوایی و ریشه‌ها) کاهش یافت و در نهایت گیاه به مرحله زایشی نرسید.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تنش کم آبی بر ویژگی‌های مورفولوژی گیاه زنیان. ns، * و ** به ترتیب غیر معنی دار و در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی دار هستند.

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک بوته	ارتفاع بوته	تعداد چتر در بوته	تعداد شاخه جانبی
تیمار	۲	۳۴/۱۳*	۳۶۳/۱۱*	۴۲۵/۴۴*	۸/۴۴*
خطا	۶	۱/۲۴	۵/۲۲	۱/۵۵	۰/۳۳
ضریب تغییرات (درصد)		۱۲/۵	۲۲/۷	۷۶	۲۹

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنش کم آبی بر صفات مورفولوژی اندازه‌گیری شده در گیاه زنیان. مقادیر میانگین سه تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

صفات	سطوح تنش		
	۹۰ درصد ظرفیت زراعی	۷۰ درصد ظرفیت زراعی	۵۰ درصد ظرفیت زراعی
وزن خشک بوته (گرم)	۲۷/۶۸ a	۲۴/۶۰ b	۲۰/۹۵ c
ارتفاع (سانتی متر)	۵۳/۶۶ a	۴۳/۰۰ b	۳۱/۶۶ c
تعداد چتر در بوته	۲۲/۳۳ a	۱۸/۳۳ b	۰/۰۰ c
تعداد شاخه جانبی	۶/۶۶ ab	۵/۳۳ ab	۳/۳۳ c

به ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بر درصد اسانس بذر زنیان افزوده شد. بالاترین درصد اسانس تولید شده مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۳/۹۶ درصد و کمترین میزان مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۲/۴۳ درصد مشاهده شد (جدول ۶).

اثر تنش کم آبی بر عملکرد اسانس: سطوح

مختلف تنش کم آبی بر عملکرد اسانس نیز تأثیر معنی داری داشت (جدول ۵). با افزایش سطح تنش از ۹۰ به ۷۰ عملکرد اسانس افزایش نشان داد. بیشترین میزان عملکرد اسانس مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۲۸/۶ و کمترین آن به میزان ۲۴/۱۱ کیلوگرم در هکتار مربوط به سطح ۹۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (جدول ۶).

اثر تنش کم آبی بر میزان پرولین: سطوح

مختلف تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر میزان پرولین داشت (جدول ۵). بیشترین میزان پرولین مربوط به تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و کمترین میزان مربوط به سطح ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با ۰/۰۲۳ میلی گرم در گرم وزن تر بود (جدول ۶).

اثر تنش کم آبی بر میزان کربوهیدرات: سطوح

مختلف تنش کم آبی همچنین تأثیر معنی داری بر میزان کربوهیدرات داشت (جدول ۵). بیشترین میزان کربوهیدرات مربوط به تیمار ۵۰ درصد ظرفیت زراعی برابر با ۲/۰۶ و کمترین میزان مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی برابر با ۰/۹۶ میلی گرم در گرم وزن خشک بود (جدول ۶).

اثر تنش کم آبی بر عملکرد بذر: سطوح مختلف

تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر عملکرد بذر داشت (جدول ۳). بیشترین عملکرد بذر مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با ۱۰۶۰/۶۲ و کمترین عملکرد مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی با ۷۱۳/۷۸ کیلوگرم در هکتار به دست آمد (جدول ۴). شایان ذکر است که در تیمار ۵۰ درصد تنش کم آبی گیاه به مرحله بذردهی نرسید.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تنش کم آبی بر عملکرد بذر در گیاه زنیان. ns، ** و * به ترتیب غیر معنی دار و در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی دار هستند.

میانگین مربعات		
منابع تغییر	درجه آزادی	عملکرد بذر در هکتار
تیمار	۲	۸۷۷۳۵۹/۱۵*
خطا	۶	۱۴۹۵/۷۵
ضریب تغییرات (درصد)		۷۹

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تنش کم آبی بر عملکرد بذر در گیاه زنیان. مقادیر میانگین سه تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

صفات	سطوح تنش		
	۹۰ درصد	۷۰ درصد	۵۰ درصد
عملکرد بذر (کیلوگرم در هکتار)	۱۰۶۰/۶۲a	۷۱۳/۰۰b	۰۰/۰۰c
ظرفیت زراعی	ظرفیت زراعی	ظرفیت زراعی	ظرفیت زراعی

اثر تنش کم آبی بر درصد اسانس: سطوح

مختلف تنش کم آبی تأثیر معنی داری بر درصد اسانس داشت (جدول ۵). با افزایش شدت تنش کم آبی از ۹۰

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تنش کم‌آبی بر شاخص‌های فیزیولوژیک و دارویی گیاه زنیان. ns، ** و * به ترتیب غیرمعنی‌دار و در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار هستند.

میانگین مربعات					
منابع تغییر	درجه آزادی	پرولین	کربوهیدرات	درصد اسانس	عملکرد اسانس
تیمار	۲	۰/۱۱*	۰/۹۰۴*	۱۲*	۷۱۱/۲*
خطا	۶	۰/۰۰۱	۰/۱۱	۰/۰۳۰	۰/۵۱۶
ضریب تغییرات (درصد)		۶۴	۳۲/۲	۸۱/۲	۷۵/۸

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر تنش کم‌آبی بر شاخص‌های فیزیولوژیک و دارویی در گیاه زنیان. مقادیر میانگین سه تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

صفات	سطوح تنش		
	۵۰ درصد ظرفیت زراعی	۷۰ درصد ظرفیت زراعی	۹۰ درصد ظرفیت زراعی
درصد اسانس	۰/۰۰ c	۳/۹۶ b	۲/۴۳ a
عملکرد اسانس (کیلوگرم در هکتار)	۰/۰۰ c	۲۸/۶ b	۲۵/۷۷ a
پرولین (میلی گرم بر گرم وزن تر)	۰/۱۴۵ c	۰/۰۸۰ b	۰/۰۲۳ a
کربوهیدرات (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	۲/۰۶ c	۱/۴۷ b	۰/۹۶ a

زراعی برابر با ۲۳/۳ درصد و کمترین میزان مربوط به تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۱۲/۳ درصد بود (جدول ۷). با افزایش تنش کم‌آبی میزان پاراسیمن نیز تغییر یافت. در تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی میزان پاراسیمن ۲۶/۶ درصد و در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی ۱۷/۵ درصد بود (جدول ۷). با افزایش تنش کم‌آبی میزان گاما ترپین در دو تیمار ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی تغییری نشان نداد (جدول ۷).

شناسایی ترکیبات اسانس با روش GC/MS: نتایج

بررسی ترکیبات اسانس نشان داد که در اسانس حاصل از بذره‌های گیاهان زنیان تحت تیمارهای ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی، ۲۱ ترکیب موجود است که تیمول، پاراسیمن و گاما ترپین بیشترین میزان ترکیبات اسانس (بیش از ۵۰ درصد) را تشکیل می‌دادند. با افزایش تنش کم‌آبی میزان تیمول افزایش یافت. بیشترین میزان تیمول مربوط به تیمار ۷۰ درصد ظرفیت

جدول ۷- درصد ترکیبات اسانس زنیان در سطوح ۹۰ درصد و ۷۰ درصد تنش کم‌آبی

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس	شاخص بازداری (RI)	مشخصات نمونه‌ها	
		تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی	تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی
2-Caren	۱۰۰۶	۰/۸	۱/۰
3-octanone	۹۹۳	۲/۳	۱/۳
a-Phylandrene	۱۰۱۱	۱/۶	۰/۸
b-phylandrene	۱۰۴۳	۱/۱	۱/۶
Candinol	۱۳۳۸	۳/۹	۱/۶

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس	شاخص بازداری (RI)	مشخصات نمونه‌ها	
		تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی	تیمار ۹۰ درصد ظرفیت زراعی
Carvacrol	۱۳۱۰	۲/۶	۳/۳
Hexadecanoic acid	۱۳۷۰	۳/۴	۳/۸
Limonene	۱۰۵۰	۰/۹	۲/۱
Linalool	۱۱۵۲	۱/۹	۷/۸
Myrcene	۹۹۸	۰/۹	۵/۶
p-cymene	۱۰۳۴	۱۷/۵	۲۶/۶
Sabinene	۹۷۱	۴/۵	۰/۹
β -pinene	۹۸۵	۱/۲	۲/۶
Terpinene-4-ol	۱۱۷۸	۳/۸	۱/۳
Thymol	۱۲۹۶	۲۳/۳	۱۲/۳
Verbenone	۱۲۶۰	۱/۰	۱/۹
α -Fenchon	۱۰۱۶	۵/۷	۲/۱
α -Pinene	۹۴۸	۱/۱	۳/۷
α -Terpinene	۱۰۲۷	۱/۳	۰/۸
α -Thujene	۹۳۶	۲/۹	۱/۲
γ -Terpinene	۱۰۶۶	۱۶/۸	۱۷

بحث

بررسی و مطالعه تأثیر انواع تنش‌ها به ویژه تنش خشکی بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاهان دارویی در جهت کاهش مصرف آب و افزایش عملکرد گیاهان حایز اهمیت است. گیاهان دارویی نظیر زنیان ممکن است در شرایط تنش ماده شیمیایی بیشتری تولید کنند و در نتیجه بازدهی اقتصادی بهتری داشته باشند. بنابراین، مطالعه روش‌هایی که بتوان از گیاه با ارزش زنیان ماده مؤثره بیشتری تولید کرد ارزشمند است.

نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه Khan و همکاران (۲۰۰۱) در گیاه ذرت که در شرایط تنش شدید خشکی، ارتفاع گیاه، ضخامت ساقه، پهنک برگ و وزن تر و خشک گیاه به طور قابل توجهی کاهش

یافت، مطابقت داشت. همچنین، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش سطوح تنش کم آبی، شاخص‌های رشدی گیاه زنیان کاهش پیدا کرد که به نظر می‌رسد این موضوع در نتیجه اختلال در فتوسنتز، تعرق و سایر فرآیندهای متابولیکی گیاه باشد (Jones and Tardieu, 1998). همچنین، Benjamin و Nielsen (۲۰۰۶) در مطالعه خود اظهار کردند تنش خشکی باعث تغییر در رشد، محتوای رنگیزه‌ها، تنظیم اسمزی و فعالیت فتوسنتزی گیاه می‌شود که به نظر می‌رسد کاهش تورژسانس سلولی در اثر کمبود آب، باعث کاهش و توسعه سلول می‌گردد. اختلاف ارتفاع در اغلب گیاهان ناشی از ویژگی‌های ژنتیکی و تغییر شرایط محیطی است و از آنجا که تقسیم و افزایش اندازه سلول

Lolium و گونه‌ای از جنس *Festuca* با کاهش محتوای نسبی آب تجمع پرولین، گزارش شده است. در تحقیق حاضر با افزایش شدت تنش، مقدار کربوهیدرات‌ها نیز افزایش قابل توجهی نشان داد که علت آن در شرایط تنش خشکی (به ویژه تنش شدید) می‌تواند به دلیل افزایش تجزیه کربوهیدرات‌های نامحلول و در نتیجه بالا رفتن سطح قندهای محلول، سنتز مواد اسمزی از مسیرهای غیرفتوسنتزی، توقف رشد، کاهش سرعت انتقال مواد و افزایش میزان سنتز سوکروز به دلیل فعالسازی آنزیم سوکروز فسفات سنتاز باشد (Arndt et al., 2001).

در مورد گیاهان دارویی، خشکی ممکن است اثر معنی‌داری بر عملکرد برخی متابولیت‌ها و ترکیبات داشته باشد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعه Petropoulos و همکاران (۲۰۰۸) که نشان دادند تنش خشکی باعث افزایش کیفیت و عملکرد اسانس در جعفری شده است، مطابقت داشت. به نظر می‌رسد در شرایط تنش خشکی تولید مواد مؤثره به علت جلوگیری از اکسیداسیون درونی سلولی افزایش می‌یابد. اعمال تنش خشکی بر گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) نیز باعث افزایش ترکیب‌های فنلی و افزایش تندی آن گردید (Estrada et al., 1999). در پژوهش حاضر، از آنجا که تنش کم‌آبی در گیاه زنیان در تیمار متوسط (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) تأثیر منفی بر عملکرد اسانس نداشت و از سویی باعث افزایش میزان درصد ترکیب مهم تیمول شد می‌توان گفت که اعمال یک تنش متوسط در دوره رشد گیاه زنیان می‌تواند موجب افزایش کیفیت آن شود.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که در اسانس بذرهای

نسبت به تنش خشکی بسیار حساس است، به نظر می‌رسد در گیاهان تحت تنش کم‌آبی، افزایش اندازه سلول تحت تأثیر قرار گرفته، با ممانعت از رشد طولی ساقه، سبب کاهش ارتفاع گیاه می‌گردد (Patel et al., 1996). نتایج پژوهش حاضر همچنین با نتایج Lebaschy و Sharifi Ashoorabadi (۲۰۰۴) که اثر تیمارهای آبیاری ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی را روی گیاهان اسفرزه، بومادران، مریم‌گلی، همیشه‌بهار و بابونه بررسی کرده بودند مطابقت دارد. آنها نتیجه گرفتند با تشدید تنش خشکی، وزن اندام هوایی و ارتفاع بوته در تمام گیاهان مطالعه شده کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد گیاه در هنگام مواجه شدن با تنش کم‌آبی، در فرآیندهای فیزیولوژیک خود تغییراتی ایجاد و از خود محافظت می‌کند (Duan et al., 2007).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش شدت تنش مقدار پرولین نیز افزایش چشمگیری داشت. به طور کلی، می‌توان گفت گیاهان در پاسخ به تنش‌های کم‌آبی باعث تجمع یا سنتز موادی مانند آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، متابولیت‌های ثانویه و عناصر معدنی می‌شوند (Barsa, 1997). یکی از پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان در برابر تنش خشکی تجمع پرولین است (Girousse et al., 1996). تنش خشکی از دو راه باعث افزایش میزان پرولین می‌شود: الف) افزایش سنتز آنزیم‌هایی که تولید پرولین را تحریک می‌کند؛ ب) ممانعت از عمل آنزیم‌هایی که پرولین را تخریب می‌کند (Rontein et al., 2002). نتایج حاضر با نتایج Mamnoei و Seyed Sharifi (۲۰۱۰) که اثر کم‌آبی را بر مقدار پرولین در گیاه جو بررسی کردند مطابقت دارد. مشابه با آن، در مطالعه Jozwiak و Bandurska (۲۰۱۰) در جنس

نتیجه‌گیری

گیاه دارویی زنیان مانند بیشتر گیاهان در برابر تنش کم‌آبی، عکس‌العمل‌های مختلف فیزیولوژیک و مورفولوژیک نشان می‌دهد. به طوری که افزایش تنش سبب کاهش بیوماس گیاه زنیان شد، میزان پرولین، کربوهیدرات و درصد اسانس افزایش یافت که نوعی سازگاری نسبت به شرایط تنش محسوب می‌شود. همچنین، با توجه به این که سطح تنش خشکی متوسط تأثیر منفی بر عملکرد اسانس نداشت و موجب افزایش درصد تیمول نیز شد می‌توان گفت که اعمال یک تنش ملایم در دوره رشد گیاه زنیان می‌تواند موجب افزایش کیفیت آن شود. با توجه به مقاومت نسبتاً مناسب زنیان به شرایط کم‌آبی، می‌توان در مقطعی از رشد گیاه با ایجاد تنش‌های محیطی مدیریت شده افزایش کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه را فراهم کرد. بنابراین، در پرورش گیاهان همان قدر که وجود آب یکی از امکانات مهم زیست محیطی است کمبود آب نیز می‌تواند باعث افزایش توان تولید مواد مؤثره شود. در نتیجه، محدودیت آب نه تنها یک عامل نامساعد، بلکه راهکاری بدون هزینه برای نوعی تولید است.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه پیام نور و دانشگاه زابل به بابت فراهم کردن امکانات انجام این تحقیق، قدردانی می‌نمایند.

گیاه زنیان تحت تیمارهای ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی ۲۱ ترکیب وجود دارد که مهم‌ترین آنها، تیمول، پاراسیمن و گاماترپینن است که بیشترین میزان مواد تشکیل دهنده اسانس (بیش از ۵۰ درصد) را شامل می‌شوند. در تحقیق حاضر، ترکیبات مهم در اسانس بذر گیاه زنیان با ترکیبات مهم همین گیاه در سایر نقاط کشور ایران و سایر کشورها مشابه بود (Srivastava et al., 1999؛ Akbarinia et al., 2005). البته میزان درصد ترکیبات مهم زنیان در مطالعه حاضر با سایر مطالعات گزارش شده متفاوت است که می‌توان علت آن را ناشی از تفاوت تکنیک‌های استخراج اسانس یا نوع دستگاه GC/MS دانست. همچنین، شرایط جغرافیایی، زیستگاهی و اقلیمی در میزان تولید این ترکیبات مؤثر است. بنابراین متابولیت‌های ثانویه گیاهان که اصلی‌ترین جنبه فیزیولوژی و بیوشیمی آنها است می‌تواند نسبت به عوامل محیطی و کم‌آبی تحت تأثیر قرار بگیرد (Charles et al., 1994). همان طور که در بررسی حاضر نیز مشخص شد مقدار ترکیبات مهم موجود در اسانس (تیمول، پاراسیمن و گاماترپینن) با اعمال تنش کم‌آبی تغییر می‌یابد. در تنش ملایم ۷۰ درصد ظرفیت زراعی میزان تیمول افزایش و دو ترکیب پاراسیمن و گاماترپینن کاهش یافت. بنابراین با توجه به این که تیمول یک ترکیب دارویی مهم اسانس زنیان است، می‌توان میزان آن را در این گیاه با اعمال تنش کم‌آبی در سطوح متوسط بالا برد.

منابع

- Aberoomand Azar, P., Mottaghianpuor, Z., Sharifan, A. and Larijani, K. (2010) Studies on the effect of extraction method on chemical composition and antimicrobial activity of *Carum copticum* essential oil. Food Technology and Nutrition 7(2): 81-75 (in Persian).
- Akbarinia, A., Sefidkon, F., Ghalavand, A., Tahmasebi Sarvestani, Z. and Sharifi Ashorabadi, A.

- (2005) A study on chemical composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) essential oil produced in Qazvin. The Journal of Qazvin University of Medical Science 9(3): 22-25 (in Persian).
- Aktuge, S. E. and Karapikar, M. (1987) Inhibition of food borne pathogens by thymol, eugenol, menthol and ethanol. International Journal of Food Microbiology 4: 161-166.
- Aliabadi, F. H., Lebaschi, M. H., Shiranirad, A. H., Valadabadi, A. R. and Daneshian, J. (2008) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, different levels of phosphorus and drought stress on water use efficiency, relative water content and proline accumulation rate of coriander (*Coriandrum sativum* L.). Journal Medicinal Plant Research 2(6): 125-131.
- Aliabadi, F. H., Valadabadi, S. A. R., Daneshian, J. and Khalvati, M. A. (2009) Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. Journal of Medicinal Plants Research 3(5): 329-333.
- Arndt, S. K. K., Clifford, S. C., Wanek, W., Jones, H. G. and Popp, M. (2001) Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. Tree Physiology 21: 705-715.
- Baghalian, K., Haghiry, A., Naghavi, M. R. and Mohammadi, A. (2008) Effect of saline irrigation water on agronomical and phytochemical characters of chamomile (*Matricaria recutita* L.). Scientia Horticulture, Amsterdam 116: 437-441.
- Bandurska, H. and Jozwiak, W. (2010) A comparison of the effects of drought on proline accumulation and peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* L. and *Lolium perenne* L. Department of Plant Physiology 79(2): 111-116.
- Barnabas, B., Jager, K. and Feher, A. (2007) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. Plant Cell and Environment 31(1): 11-38.
- Barsa, A. (1997) Mechanism of environmental stress resistance in plant. Harward Academic Press, Harward.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, L. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-208.
- Benjamin, J. G. and Nielsen, D. C. (2006) Water deficit effects on root distribution of soybean, field pea and chickpea. Field Crops Research 97: 248-253.
- Charles, O., Joly, R. and Simon, J. E. (1994) Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition of *Peppermint*. Phytochemistry 29: 2837-2840.
- Davazdah Emami, S., Sefidkon, F., Jahansooz, M. R. and Mazaheri, D. (2010) Evaluation of water salinity effects on yield and essential oil content and composition of *Carum copticum*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25(4): 504-512 (in Persian).
- Duan, B., Yang, Y., Lu, Y., Korpelainen, H., Berninger, F. and Li, C. (2007) Interactions between water deficit, ABA, and provenances in *Picea asperata*. Journal of Experimental Botany 58(11): 3025-3036.
- Dubious, M. K., Gilles, A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related. Annual Chemistry 28: 350-356.
- Estrada, B., Pomar, F., Díaz, J., Merino, F. and Bernal, M. A. (1999) Pungency level in fruits of the *Padron pepper* with different water supply. Scientia Horticulture 81(4): 385-396.
- Girousse, C., Bournoville, R. and Bonnemain, J. L. (1996) Water deficit induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of *Alfalfa*. Plant Physiology 111: 109-113.

- Hasani, A. (2006) Effect of water deficit stress on growth, yeild and essential oil content of *Dracocephalum moldavica*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 22(3): 251-261 (in Persian).
- Hasani, A., Omidbaigi, R. and Heidarisharif Abad, H. (2004) Study of some drought resistance indices in basil (*Osmimum basilicum*). Journal of Agriculture Science and Natural Resource 10(4): 65-74 (in Persian).
- Jones, H. G. and Tardieu, F. (1998) Modeling water relations of horticultural crops. Sciential Horticulture 74: 21-46.
- Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K. G. (2004) Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill. on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresource Technology 93(3): 307-311.
- Khalid, Kh. A. (2006) Influence of water stress on growth, essential oil and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). International Agrophysics 20: 289-296.
- Khan, A. S., Ul-Allah, S. and Sadique, S. (2010) Genetic variability and correlation among seedling traits of Wheat (*Triticum sativum*) under water stress. International Journal of Agriculture and Biology 12(2): 247-250.
- Khan, M. B., Hussain, N. and Iqbal, M. (2001) Effect of water stress on growth and yield components of maize variety YHS 202. Journal of Research (Science) Bahoddin Zakariya University 12(1): 15-18.
- Lebaschy, M. H. and Sharifi Ashoorabadi, A. (2004) Growth indices of some medicinal plants under different water stresses. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2(3): 249-261 (in Persian).
- Mamnoei, E. and Seyed Sharifi, R. (2010) Study the effects of deficit on chlorophyll fluorescence indices and the amont of proline in six barely genotypes and its relation with canopy temperature and yield. Journal of Plant Biology 2(5): 51-62.
- Misra, A. and Srivastava, N. K. (2000) Influence of water stress on Japanese mint. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 7(1): 51-58.
- Mohamed, M. A. H., Harris, P. J. C., Henderson, J. and Senatore, F. (2002) Effect of drought stress on the yield and composition of volatile oils of drought- tolerant and non-drought-tolerant clones of *Tagetes minuta*. Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research 68(5): 472-474.
- Najafi, Sh. (2011) Medicinal plants. Marandiz Press, University of Zabol, Zabol (in Persian).
- Patel, B. S., Sadaria, S. G. and Patel, J. C. (1996) Influence of irrigation, nitrogen and phosphorus on yield, nutrient uptake and water use efficiency of blond pysllium (*plantago ovate*). Indian Journal of Agronomy 41: 136-139.
- Petropoulos, S. A., Daferera, D., Polissiou, M. G. and Passam, H. C. (2008) The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. Sciential Horticulture 15(4): 393-397.
- Rahmani, N., Aliabadi Farahani, H. and Valadabadi, S. A. R. (2008) Effects of nitrogen on oil yield and its component of Calendula (*Calendula officinalis* L.) in drought stress conditions on medicinal and aromatic plants. 1st Western Africa Network Of Natural Products Research Scientists (WannPreS) Conference and The AJTCAM Symposium On African Traditional Medicines, Cape Town, South Africa.
- Rontein, D., Basse, T. G. and Hason, A. D. (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. Metabolic Engineering 4: 49-56.
- Salama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savoure, A. and Abdelly, C. (2007) Comparative

- study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Botany* 61: 10-17.
- Serraj, R. and Sinclair, T. R. (2002) Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions. *Plant Cell and Environment* 25: 333-341.
- Sharifi Ashoorabadi, E., Matin, M., Lebaschi, H., Abbaszadeh, B. and Naderi, B. (2005) Effects of water stress on quantity yield in *Achillea millefolium*. 1st International Conference on The Theory and Practices in Biological Water Saving, Beijing, China
- Srivastava, M., Saxena, A. and Baby, P. (1999) GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of *Carum copicum*. *Acta Alimentaria* 28(3): 291-295.
- Topp, G. G. and Davies, J. L. (1985) Time domain reflectometry (TDR) and its application to irrigation scheduling. *Advances in Irrigation* 3: 107-127.
- Yadav, O. P. and Bhathagar, S. K. (2001) Evaluation of indices for identification of pearl millet cultivars adapted to stress and non stress condition. *Field Crops Science* 70: 201-208.
- Zargari, A. (1998) Medicinal plants. vol. 2, Tehran University Press, Tehran (in Persian).

باززایی درون شیشه برخی ژنوتیپ‌های ایرانی یونجه (*Medicago sativa* L.) از طریق جنین‌زایی بدنی

سهراب عابدی^۱، ناصر زارع^{۱*}، رسول اصغری زکریا^۱، پریسا شیخ‌زاده مصدق^۱ و مجید شکرپور^۲
^۱گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۲گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

وجود سیستم بهینه باززایی درون شیشه یکی از پیش‌نیازهای دستکاری ژنتیکی واریته‌ها و ژنوتیپ‌های گیاهان است. در پژوهش حاضر، جنین‌زایی بدنی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ چهار ژنوتیپ یونجه به نام‌های ۱۸-۶ (سیستیک)، ۱۴-۴ (قره یونجه قره قزلو)، ۲۷-۳ (قره یونجه مراغه) و ۶-۶ (Regen-SY) بررسی شد. تشکیل کالوس و جنین‌زایی بدنی به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع ریزنمونه و اثر متقابل ژنوتیپ × محیط کشت قرار گرفت. بیشترین وزن تر کالوس (۰/۴۰۶ گرم) در ریزنمونه‌های برگ ژنوتیپ ۱۴-۴ مشاهده شد. درصد جنین‌زایی بدنی و تعداد جنین در هر کالوس حاصل از ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۴-۴ بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها بود. در ژنوتیپ ۱۸-۶، بیشترین درصد جنین‌زایی بدنی با استفاده از ریزنمونه برگ روی محیط کشت القای حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین به دست آمد. بین جنین‌های حاصل از ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف از نظر فراوانی تبدیل جنین به گیاهچه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و به طور میانگین، ۵۸ درصد از جنین‌های کشت شده روی محیط کشت MS به گیاهچه طبیعی تبدیل شدند. جنین‌زایی بدنی ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ در نسبت‌های بالاتر ۱ به ۵ کینتین به 2,4-D، در حالی که ریزنمونه ژنوتیپ ۱۸-۶ در نسبت ۱ به ۲/۵ از کینتین به 2,4-D فرآیند جنین‌زایی موفق را نشان نداد. جنین‌های تولید شده از کارآیی خوبی برای تبدیل شدن به گیاهچه برخوردار بودند و از روش ارایه شده در این تحقیق می‌توان در مطالعات مولکولی و مهندسی ژنتیک این گیاه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: جنین‌زایی بدنی (سوماتیک)، باززایی درون شیشه، یونجه (*Medicago sativa* L.)

مقدمه

نقش عمده‌ای در تغذیه دام، حفاظت و بهبود نیتروژن خاک دارد. خاستگاه آن شمال ترکیه، ترکمنستان و شمال غرب ایران است (Tsfaye et al., 2009)؛

یونجه گیاهی است علفی از تیره باقلاییان (Fabaceae) با نام علمی *Medicago sativa* L. که

(Takavar, 2012). مهم‌ترین عامل مؤثر در تفاوت بین کشت‌های جنین‌زا و غیرجنین‌زا، سطوح متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی بافت است (Grieb *et al.*, 1997).

پاسخ باقلاییان نسبت به اکسین بسته به نوع اکسین استفاده شده متفاوت است (Turgut-Kara and Sule, 2008). در گیاه یونجه 2,4-D یکی از قوی‌ترین اکسین‌هایی است که در القای کالوس‌زایی و تشکیل جنین‌بدنی نقش دارد (Lakshmanan and Taji, 2000). سیتوکینین‌ها نیز در همکاری با اکسین جهت القای جنین‌بدنی مؤثر هستند و در تسریع بلوغ جنین به ویژه در رشد و نمو لپه‌ها مؤثر هستند. علاوه بر این، در بعضی مواقع سیتوکینین‌ها برای رشد جنین و تبدیل آن به گیاهچه لازم هستند (Jimenez and Thomas, 2005). باززایی یونجه معمولاً از طریق جنین‌زایی بدن انجام می‌گیرد و به شدت به ژنوتیپ گیاهی و روش باززایی وابسته است (Zare *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2000).

Iantcheva و همکاران (۲۰۰۱) جنین‌زایی بدن پنج‌گونه دیپلوئید یونجه یک‌ساله را از ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ در کشت تعلیقی بررسی کردند. محیط کشت شامل ۱ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین برای جنین‌زایی مناسب تشخیص داده شد. Zare و همکاران (۲۰۰۹) با ارزیابی باززایی پنج‌رقم یونجه، ژنوتیپ‌هایی با قابلیت باززایی در شرایط درون‌شیشه را گزینش کردند. با این حال، در برخی از ژنوتیپ‌ها پاسخ جنین‌زایی پایین بود. بنابراین، بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت برای رسیدن به فراوانی باززایی مطلوب ضروری است.

زیست فناوری و به ویژه مهندسی ژنتیک گیاهی

(Mohammadzadeh *et al.*, 2011). امروزه کشت بافت از ابزارهای مهم بیوتکنولوژی در اصلاح، تلاقی‌های بین‌گونه‌ای، تکثیر بافت‌ها، سلول‌ها و ژنوتیپ‌های خاص، تولید بذور مصنوعی و مهندسی ژنتیک یونجه به شمار می‌رود. همچنین، از کشت بافت یونجه برای ایجاد تنوع سوماکلونال و گزینش گیاهان مطلوب مانند تولید گیاهان یونجه مقاوم به آلومینیوم یا اسید، متحمل به شوری و گیاهان مقاوم به پژمردگی فوزاریوم استفاده شده است (Piccioni *et al.*, 1996).

باززایی یونجه در کشت بافت معمولاً از طریق جنین‌زایی بدن مستقیم از سلول‌های ریزنمونه یا غیرمستقیم از سلول‌های کالوس صورت می‌گیرد. جنین‌زایی بدن فرآیندی است که در آن سلول‌های بدن بدون اتحاد گامت‌ها و پس از طی مراحل جنین‌زایی به گیاه کامل تبدیل می‌شود (Perrin *et al.*, 2004). یکی از موارد مهم در جنین‌زایی بدن توانایی تشکیل جنین‌هایی است که رشد کرده، به گیاه کامل تبدیل شود (Leroy *et al.*, 2000). این پتانسیل عمدتاً به شرایط فیزیولوژیک و ژنتیک سلول و بافت، محیط کشت مناسب و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بستگی دارد. توانایی ظهور جنین بدن تحت شرایط مناسب فیزیولوژی و در پاسخ به علامت القای می‌شود (Feher, 2008). از سوی دیگر، ریزنمونه‌های جدا شده از گیاه مادر، پس از کشت دیگر اتوتروف نیستند. لذا، مواد موجود در محیط کشت برای رشد ریزنمونه‌ها اهمیت خاصی دارد. بنابراین، نوع و غلظت مواد محیط کشت می‌تواند بر چگونگی رفتار ریزنمونه‌ها از لحاظ جنین‌زایی بدن اثر داشته باشد (Ivanova *et al.*, 1994; Burrell *et al.*, 2006; Rahnama and

جنین‌زایی بدنی، شامل محیط کشت (Murashige MS and Skoog, 1962) حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین ارزیابی شد. با توجه به این که ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ در این آزمایش جنین‌زایی بدنی نشان نداد، تأثیر سطوح مختلف 2,4-D (۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر) و کینتین (۵/۰، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) در محیط کشت القا، بر جنین‌زایی این ژنوتیپ بررسی شد.

تهیه ریزنمونه: ژنوتیپ‌های استفاده شده از طریق کشت جوانه‌های جانبی در محیط کشت MS جامد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در شرایط درون شیشه تکثیر و در اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور فلوروسنت (۹۰۰ لوکس) نگهداری شدند. دمبرگ‌ها و سه برگچه‌ای‌های تازه رشد یافته پس از ۴ تا ۶ هفته توسط اسکالپل تیز در شرایط سترون به قطعات تقریبی ۲۰-۲۵ میلی‌متر مربع و دمبرگ‌ها به قطعاتی با اندازه ۴-۵ میلی‌متر در پتری‌دیش حاوی آب مقطر بریده شدند.

کشت و باززایی درون شیشه: ریزنمونه‌های تهیه شده بلافاصله روی محیط کشت القای جنین (محیط MS حاوی غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و کینتین) به ظروف پتری‌دیش 20×100 میلی‌متری منتقل شدند. در هر پتری‌دیش پنج عدد از هر ریزنمونه کشت شد. ریزنمونه‌ها پس از سپری شدن مدت زمان القای جنین (سه هفته) به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند تا جنین‌های بدنی تشکیل شوند. پس از سه هفته کالوس‌ها و جنین‌های بدنی تولید شده به مدت دو تا سه هفته برای رشد بیشتر به محیط Boi2Y [محیط Blaydes به اضافه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول و ۲

می‌تواند نقش بسیار مهم و مفیدی در اصلاح و ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، افزایش کیفیت پروتئین و هضم‌پذیری، بهبود عملکرد و ارزش غذایی گیاه یونجه داشته باشد. گیاه یونجه به علت اتوتتراپلوئید بودن، خودناسازگاری، دگرگشن بودن (cross pollination)، هتروزیگوسیتی و ناهمگنی بالا در ژرم‌پلاسما، تنوع درون و بین واریته‌های بالایی برای جنین‌زایی بدنی دارد، به طوری که هنوز باززایی طیف وسیعی از ارقام یونجه ممکن نشده است. این وضعیت، اصلاح ژنتیکی یونجه با روش‌های زیست‌فناوری را محدود کرده است (Zare et al., 2009). به بیان دیگر، وجود یک سیستم مؤثر باززایی درون شیشه، نخستین گام در بهره‌گیری از روش‌های دستکاری ژنتیکی برای بهبود ویژگی‌های کمی و کیفی واریته‌های بومی و سازگار این گیاه است (Vlahova et al., 2005). بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی محیط کشت برای جنین‌زایی بدنی غیرمستقیم از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ژنوتیپ‌های ایرانی یونجه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر از چهار ژنوتیپ یونجه به نام‌های ۱۸-۶ (انتخاب شده از رقم سینتیک دانشگاه تبریز)، ۱۴-۴ (انتخاب شده از رقم قره یونجه قره قزلو)، ۲۷-۳ (انتخاب شده از رقم قره یونجه مراغه) و y-6 (انتخاب شده از رقم Regen-SY) استفاده شد.

محیط کشت: پژوهش حاضر در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. ابتدا پاسخ جنین‌زایی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ هر چهار ژنوتیپ در محیط کشت القای

وزن تر کالوس: وزن تر کالوس‌ها در ریزنمونه‌های برگ به طور معنی داری بیشتر از ریزنمونه‌های دم‌برگ بود. از لحاظ وزن تر کالوس بین ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۲ و جدول ۱). کالوس‌های حاصل از ژنوتیپ ۴-۱۴ نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از رشد (وزن تر) بیشتری برخوردار بودند. همچنین، وزن تر کالوس تحت تأثیر اثر متقابل بین ژنوتیپ و ریزنمونه نیز قرار گرفت. بیشترین وزن تر کالوس در ریزنمونه‌های برگ (۰/۴۰۶ گرم) و دم‌برگ (۰/۳۷۳ گرم) ژنوتیپ ۴-۱۴ و کمترین آن در ریزنمونه‌های برگ (۰/۱۹۹ گرم) و دم‌برگ (۰/۰۸۹ گرم) ژنوتیپ ۶-۷ مشاهده شد (جدول ۱). در ژنوتیپ ۱۸-۶، ترکیب محیط کشت، نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین آنها اثر معنی داری بر وزن تر کالوس داشت. بیشترین وزن تر کالوس به ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کیتین متورم (۰/۶۵۹ گرم) و محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کیتین (۰/۶۰۰) تعلق داشت. اما کمترین وزن کالوس (۰/۱ گرم) از ریزنمونه دم‌برگ در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کیتین و بیشترین وزن کالوس (۰/۲۸۱ گرم) از ریزنمونه دم‌برگ محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کیتین به دست آمد. کمترین میزان رشد کالوس در ریزنمونه‌های برگ (۰/۳۲۷) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر کیتین بود که تفاوت معنی‌داری با محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کیتین، در ریزنمونه دم‌برگ نداشت (جدول ۲).

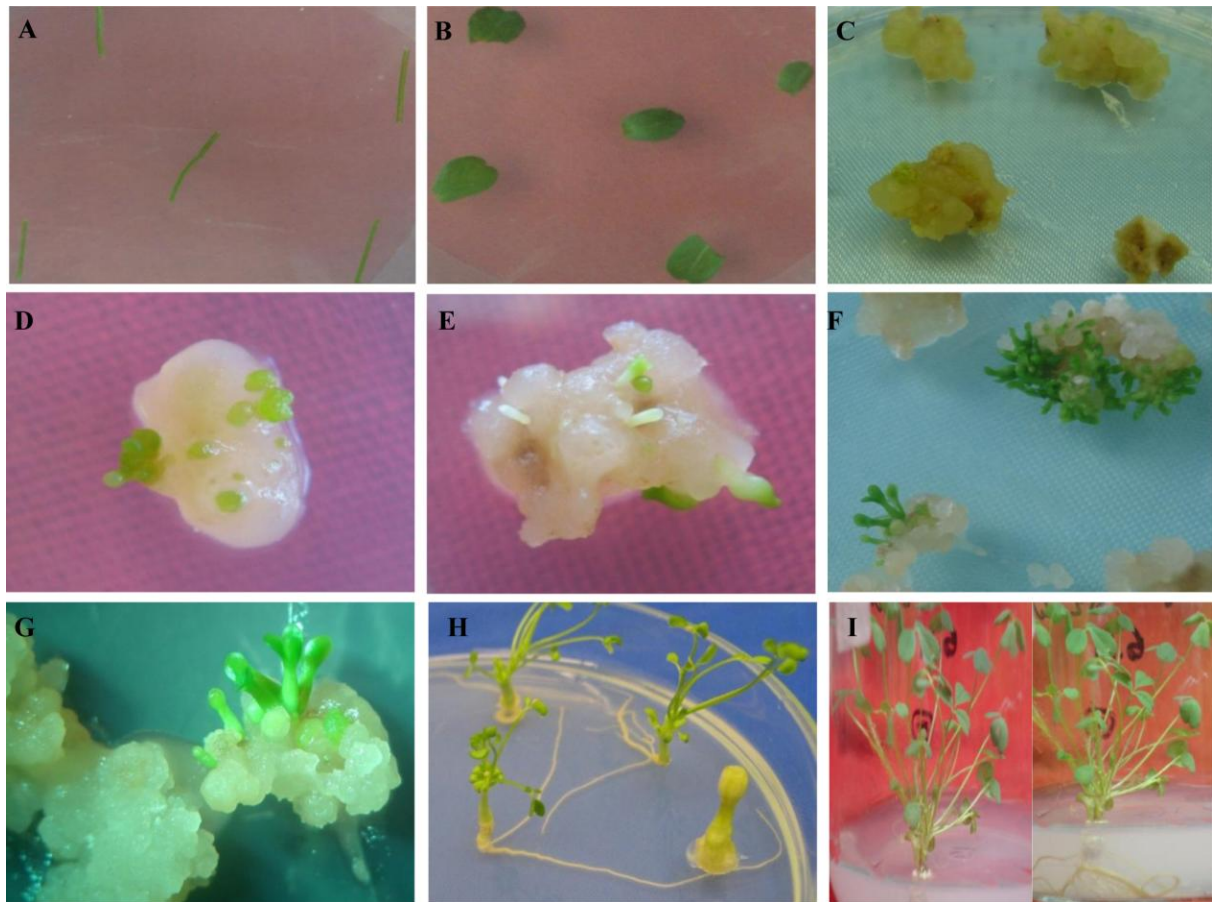
گرم بر لیتر عصاره مخمر (Shao *et al.*, 2000) منتقل شدند. پس از آن، به مدت دو هفته دیگر به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند. جنین‌های بالغ (لپه‌ای شکل) از کالوس جدا و به منظور تبدیل شدن به گیاهچه (تولید ریشه و ساقه) به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. صفاتی نظیر: درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس‌ها، درصد جنین‌زایی بدنی، تعداد جنین در هر ریزنمونه و درصد تبدیل جنین به گیاهچه در تمامی تیمارها یادداشت شد.

تحلیل داده‌ها: داه‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹

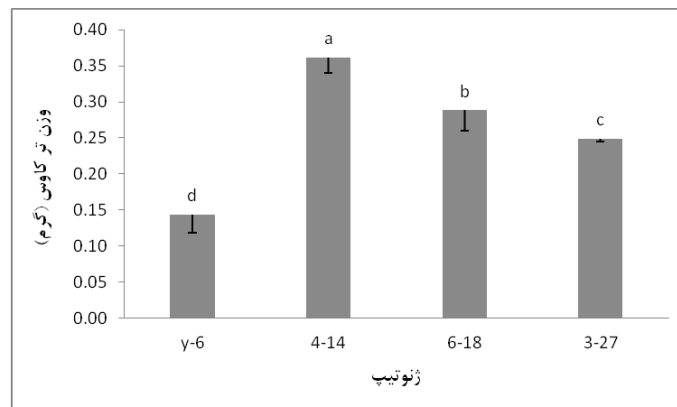
تحلیل شد. تمامی داده‌ها میانگین سه تکرار است.

نتایج

تشکیل کالوس: تشکیل کالوس با تغییر شکل و متورم شدن ریزنمونه‌ها ۶ تا ۸ روز پس از کشت ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ آغاز و پس از ۱۴ تا ۲۱ روز تکمیل شد و توده‌های سلولی پیش‌جنینی شکل گرفتند. کالوس‌های تولید شده زرد مایل به سبز کم‌رنگ و نرم بودند (شکل ۱-A، B و C). تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت معنی‌داری در بین ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها از نظر کالوس‌زایی نشان نداد. ژنوتیپ‌های بررسی شده در محیط کشت حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کیتین کالوس‌زایی خوبی داشتند. تجزیه واریانس داده‌ها در ژنوتیپ ۱۸-۶ تفاوت معنی‌داری در بین محیط کشت‌ها و ریزنمونه‌های استفاده شده از نظر کالوس‌زایی نشان نداد. تشکیل کالوس در تمامی محیط کشت‌ها و از همه ریزنمونه‌ها مشاهده شد.



شکل ۱- تشکیل کالوس، جنین‌زایی بدنی و باززایی یونجه در شرایط درون شیشه. A و B) به ترتیب ریزنمونه دمبرگ و برگ تازه تهیه شده؛ C) کالوس‌های جنین‌زای ایجاد شده روی محیط القا؛ D) جنین‌های بدنی در مراحل کروی و قلبی شکل؛ E) جنین‌های بدنی در مرحله رشدی نیزه‌ای شکل؛ F و G) جنین‌های بدنی بالغ لپه‌ای شکل؛ H) تبدیل جنین بدنی بالغ به گیاهچه؛ I) گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌های بدنی بالغ در شرایط درون شیشه



شکل ۲- میانگین وزن تر کالوس تولید شده در ژنوتیپ‌های مطالعه شده یونجه. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ۱- میانگین وزن تر کالوس و درصد جنین‌زایی بدنی در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های مطالعه شده یونجه. حروف متفاوت در هر صفت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

ژنوتیپ	وزن تر کالوس		درصد جنین‌زایی بدنی		تعداد جنین در هر کالوس	
	برگ	دمبرگ	برگ	دمبرگ	برگ	دمبرگ
y-6	۰/۱۹۹ ^c	۰/۰۸۹ ^f	۸۶/۶۶ ^{ab}	۸۰ ^{ab}	۴/۵۵ ^b	۵/۰۱۷ ^b
4-14	۰/۴۰۶ ^a	۰/۳۷۳ ^c	۸۰ ^{ab}	۱۰۰ ^a	۵/۰۵۳ ^b	۷/۴ ^a
6-18	۰/۳۴۸ ^b	۰/۲۲۹ ^{de}	۹۳ ^{ab}	۰ ^c	۴/۲۵ ^b	۰ ^c
3-27	۰/۲۵۱ ^d	۰/۲۴۸ ^d	۶۶/۶۶ ^{ab}	۷۳ ^{ab}	۳/۴۸۳ ^b	۳/۹۲۷ ^b
میانگین	^a ۰/۳۰۱	^b ۰/۲۲۰۸	^a ۸۱/۶۶	^b ۶۳/۳۳	^a ۴/۳۳۴	^a ۴/۰۸۶

تأثیر نوع ریزنمونه و اثر متقابل آن با ترکیب هورمونی محیط کشت قرار گرفت. بیشترین درصد جنین‌زایی بدنی در ریزنمونه‌های برگ (۹۳/۳۳ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین مشاهده شد. در حالی که در این محیط کشت هیچ‌گونه جنین‌زایی بدنی از ریزنمونه دمبرگ مشاهده نشد. در سایر محیط‌کشت‌ها تفاوت معنی‌داری بین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از نظر درصد جنین‌زایی بدنی وجود نداشت (جدول ۲).

تعداد جنین در کالوس و تبدیل جنین به

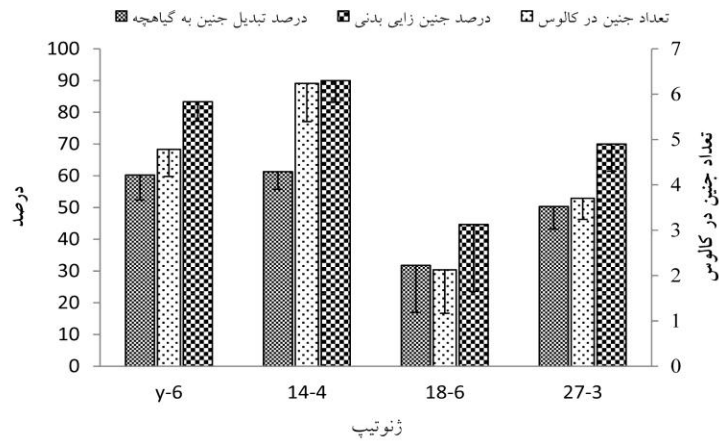
گیاهچه: بین ژنوتیپ‌ها از نظر تعداد جنین در کالوس و همچنین درصد تبدیل جنین به گیاهچه اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۳). بیشترین میانگین تعداد جنین بدنی تولید شده در هر کالوس (۷/۴ عدد) در ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۴-۱۴ به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۱). مرحله‌نهایی فرآیند جنین‌زایی بدنی قابلیت رشد آنها و تبدیل شدن به گیاهچه کامل است و موفقیت در باززایی گیاه از طریق جنین‌زایی بدنی تا حد زیادی بستگی به آن دارد. برای این منظور جنین‌های بالغ (شکل ۱-G) به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند. در این محیط، مریستم‌های

جنین‌زایی بدنی: کالوس‌های جنین‌زای نرم و زرد یا

سبز کم‌رنگ و کالوس‌های غیر جنین‌زای فشرده و متمایل به قهوه‌ای‌رنگ بودند. در بین کالوس‌ها هم از نظر زمان جنین‌زایی و تکامل جنین‌ها و هم از نظر تعداد جنین‌های ظاهر شده در هر کالوس تفاوت وجود داشت (شکل ۱- E، D، و F). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر ریزنمونه و ژنوتیپ بر جنین‌زایی بدنی یونجه معنی‌دار بود. البته اثر متقابل بین ریزنمونه و ژنوتیپ نیز برای این صفت معنی‌دار به دست آمد. به‌طور کلی، درصد جنین‌زایی بدنی ژنوتیپ‌های ۱۴-۴ و y-6 به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود (شکل ۳). بیشترین درصد جنین‌زایی بدنی از کالوس‌های ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۴-۴ به دست آمد. اما کالوس‌های حاصل از ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ اصلاً جنین بدنی تولید نکردند. بین جنین‌زایی بدنی ریزنمونه برگ ژنوتیپ‌های ۱۸-۶ و ۱۴-۴ و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ژنوتیپ‌های ۲۷-۳ و y-6 اختلاف چندانی مشاهده نشد. به طوری که کمترین جنین‌زایی بدنی در کالوس‌های ریزنمونه برگ ژنوتیپ ۲۷-۳ (۶۶/۶۶ درصد) و بیشترین آن در کالوس‌های ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ (۹۳ درصد) به دست آمد (جدول ۱). در ژنوتیپ ۱۸-۶، جنین‌زایی بدنی به‌طور معنی‌داری تحت

نظر تعداد جنین در کالوس تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اغلب ریزنمونه‌ها چندین جنین بدنی، برخی از آنها یک جنین بدنی تولید کردند و برخی نیز اصلاً جنین تولید نکردند. بیشترین تعداد جنین در کالوس به ریزنمونه برگ (۴/۲۵ عدد) در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین تعلق داشت (جدول ۲). اما کارآیی تبدیل جنین به گیاهچه تحت تأثیر هیچ کدام از عوامل ریزنمونه، محیط کشت و اثر متقابل قرار نگرفت.

ریشه‌چه و ساقه‌چه فعال و به گیاهچه‌ای کامل دارای ریشه، شاخه و برگ تبدیل می‌شود (شکل ۱-H و I). به طور کلی، در بررسی حاضر، بین ژنوتیپ‌های استفاده شده از نظر قابلیت و درصد تبدیل جنین به گیاهچه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. به طور میانگین، ۵۸ درصد از جنین‌های بدنی بالغ منتقل شده روی محیط کشت MS رشد کردند و به گیاهچه‌های معمولی تبدیل شدند. این امر نشان دهنده کیفیت نسبتاً خوب جنین‌های بدنی تولید شده در این تحقیق است. در ژنوتیپ ۱۸-۶، بین محیط‌های کشت و نوع ریزنمونه از



شکل ۳- میانگین درصد جنین‌زایی بدنی و تبدیل جنین به گیاهچه و تعداد جنین در هر کالوس در ژنوتیپ‌های یونجه. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ۲- میانگین صفات مربوط به القا و تولید جنین بدنی در ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ ژنوتیپ ۱۸-۶ یونجه در محیط کشت‌های حاوی سطوح متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی؛ حروف متفاوت در هر صفت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

تعداد جنین در کالوس			درصد جنین‌زایی بدنی			وزن تر کالوس			محیط کشت
میانگین	برگ	دم‌برگ	میانگین	برگ	دم‌برگ	میانگین	برگ	دم‌برگ	
۲/۵ a	۲/۳۳ abc	۲/۶۶۷ ab	۲۳/۳۳ a	۲/۶۶۷ b	۲۰ b	۰/۲۳۵ b	۰/۳۲۷ bc	۰/۱۴۳ de	MS + 10 mg/L 2,4-D + 1 mg/L Kin
۱/۱۳۸ a	۱/۱۱ bc	۱/۱۶۷ bc	۲۶/۶۷ a	۳۳/۳۳۳ b	۲۰ b	۰/۴۴۰ a	۰/۶ a	۰/۲۸۱ bc	MS + 10 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kin
۱/۳۳ a	۱ bc	۱/۱۶۷ bc	۲۶/۶۷ a	۲۶/۶۶۷ b	۲۶/۶۷ b	۰/۳۸۰ a	۰/۶۵۹ a	۰/۱ e	MS + 5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L Kin
۲/۱۲۵ a	۴/۲۵ a	۰ c	۴۶/۶۷ b	۹۳/۳۳۳ a	۰ c	۰/۲۸۸ b	۰/۳۴۸ b	۰/۲۲۹ cd	MS + 5 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kin
	۲/۱۷۳ a	۱/۳۷۵ b		۴۵/۰۰ a	۱۶/۶۶ b		۰/۴۸۴ a	۰/۱۸۸ b	میانگین

بحث

تفاوت مشاهده شده بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر وزن تر کالوس، درصد جنین‌زایی بدنی و تعداد جنین در هر کالوس ممکن است علاوه بر هتروزیگوسیتی شدید، ناهمگنی و دگرگرفته‌افشان بودن گیاه یونجه (Petolescu and Nedelea, 2009)، به متفاوت بودن میزان و تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی، متفاوت بودن ژن‌های تنظیم‌کننده پاسخ به باززایی و تنوع آلی نیز نسبت داده شود (Bhaskaran؛ Luica *et al.*, 1997؛ and Smith, 2002). مطالعات متعدد نشان داده است که جنین‌زایی بدنی در یونجه به صورت ژنتیکی تنظیم می‌شود. به طوری که اغلب پژوهشگران اثر غالبیت کامل یا ناقص ژنی و اثر ایپستازی در رابطه با تشکیل کالوس و جنین‌زایی را مؤثر دانسته‌اند (Jimenez and Bangerth, 2001). میزان و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد درونی نقش بسیار مهمی در تنظیم فرآیندهای تمایز یابی دارند. به این علت، برخی از محققان بر این باور هستند که تفاوت اصلی بین ژنوتیپ‌ها از نظر جنین‌زایی بدنی می‌تواند متأثر از درجات متفاوت قابلیت آنها از نظر تولید تنظیم‌کننده‌های رشد درونی باشد (Newman *et al.*, 1996؛ Grieb *et al.*, 1997). در آزمایشی روی هویج، نشان داده شد که ژنوتیپ‌هایی که توانایی جنین‌زایی بیشتری دارند، از سطوح IAA داخلی بالاتری نیز برخوردار بودند. از سوی دیگر، نشان داده شده است که در پروتوپلاست‌های یونجه میزان IAA درونی هم به شکل آزاد و هم به شکل ترکیبی در پاسخ به 2,4-D افزایش می‌یابد (Pasternak *et al.*, 2000). بر اساس یافته‌های Taji و Lakshmanan (۲۰۰۰) مبنی بر نقش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در تشکیل و رشد

کالوس در کشت بافت و به ویژه نقش 2,4-D در القای جنین‌زایی بدنی و نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های صورت گرفته در گیاهان دیگر، به نظر می‌رسد که در گیاه یونجه این دو گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس و پیشبرد سلول‌ها به سمت جنین‌زایی بدنی نقش مهمی دارند.

تأثیر سطوح مختلف 2,4-D و کیتین بر ژنوتیپ ۱۸-۶ در تمام صفات بررسی شده به غیر از قابلیت تبدیل جنین به گیاهچه و اثر متقابل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه معنی‌دار بود. این امر نشان می‌دهد که ریزنمونه‌ها نسبت به ترکیب غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D و کیتین واکنش متفاوتی نشان می‌دهند. برای نمونه، در غلظت‌های مساوی کیتین، غلظت بالای 2,4-D سبب افزایش رشد کالوس و کاهش جنین‌زایی در ریزنمونه برگ شد. به طوری که در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کیتین و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مقدار کالوس تولید شده توسط هر ریزنمونه نسبت به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کیتین و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشتر بود. اما درصد جنین‌زایی ریزنمونه برگ در محیط دوم به طور معنی‌داری بیشتر از محیط اول بود (جدول ۲). در حالی که نتایج بررسی‌های Stuart و همکاران (۱۹۸۵) روی کشت تعلیقی یونجه با غلظت بالای 2,4-D (۱۱ میلی‌گرم بر لیتر) نشان داد که میزان بالای 2,4-D به تولید جنین‌های بدنی منجر گردید.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر در مورد توانایی تشکیل کالوس و جنین‌زایی بدنی در ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس و جنین‌زایی

روی چغندر قند، با افزایش کینتین به محیط کشت‌های دارای 2,4-D وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها افزایش یافت. Bingham و همکاران (۱۹۷۵) گزارش کردند که نسبت اکسین و سیتوکینین در محیط کالوس‌زایی تأثیر بسیار زیادی در جنین‌زایی دارد. تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی نظیر تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی گیاه، همان مسیر متابولیسمی را طی می‌کند که ممکن است برای گیاه مفید یا مضر باشد. بنابراین، نتایج متفاوتی از کاربرد آنها در غلظت‌های متفاوت می‌توان انتظار داشت (Rashid *et al.*, 2004). بنابراین، با توجه به هدف مورد نظر در کشت بافت، نوع ژنوتیپ و ریزنمونه مورد نظر، باید از ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب استفاده گردد.

جمع‌بندی

به طور کلی، پژوهش حاضر روش مناسبی را برای باززایی درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های انتخاب شده از ارقام ایرانی یونجه معرفی می‌کند که علاوه بر مهیا نمودن درصد بالای جنین‌زایی بدنی و همچنین تعداد جنین در هر ریزنمونه، جنین‌های حاصل نیز از کیفیت خوبی برای تبدیل شدن به گیاهچه برخوردار هستند.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

بدنی مؤثر بوده است و حجم کالوس تأثیر چندانی در پتانسیل جنین‌زایی ندارد. Radhika و همکاران (۲۰۰۶) معتقدند که 2,4-D مهم‌ترین نقش را در جنین‌زایی بدنی دارد و غلظت‌های مختلف آن واکنش‌های متفاوت را باعث می‌شود و نقش مهمی در تغییر سطوح تنظیم‌کننده‌های درونی در ریزنمونه دارد. در ریزنمونه‌های برگ، رابطه‌ای بین غلظت‌های متفاوت 2,4-D و کینتین، با وزن کالوس و تعداد جنین در کالوس وجود داشت. به طوری که وزن کالوس در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با افزایش کینتین و در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر با کاهش کینتین، افزایش یافت. برعکس، تعداد جنین در کالوس در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با کاهش کینتین، و در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با افزایش کینتین، افزایش یافت (جدول ۲). اما در ریزنمونه دم‌برگ جنین روند مشخصی وجود نداشت. این تغییرات را می‌توان به میزان غلظت و اثر تنظیم‌کننده‌های درونی در اندام‌های مختلف گیاه نسبت داد (Radhika *et al.*, 2006). Mitten و همکاران (۱۹۸۴) گزارش کردند که برای باززایی بایستی ابتدا کالوس در محیط کشت حاوی 2,4-D زیاد و کینتین کم تشکیل شود سپس در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد زیرکشت شود. Zhao و همکاران (۲۰۰۱) معتقدند مقادیر اندک سیتوکینین در محیط کشت حاوی اکسین تأثیر مطلوبی بر تشکیل کالوس دارد. به طوری که در بسیاری از گونه‌های دیگر استفاده از مقادیر اندک سیتوکینین توصیه شده است. البته بر اساس مطالعه Gurel و همکاران (۲۰۰۱)

منابع

Bhaskaran, S. and Smith, R. H. (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*

30: 1328-1337.

- Bingham, E. T., Hurley, L. V., Kaatz, D. M. and Saunders, J. W. (1975) Breeding alfalfa which regenerates from callus in culture. *Crop Science* 15: 719-721.
- Burrell, A. M., Lineberger, R. D., Rathore, K. S. and Byrne, D. H. (2006) Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. *Horticultural Science* 41: 1165-1168.
- Feher, A. (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica* 52: 53-56.
- Grieb, B., Schfer, F., Imani, J., Mashayekhi, K., Arnholdtschmitt, B. and Neumann, K. H. (1997) Changes in soluble proteins and phytohormone concentrations of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 71: 94-103.
- Gurel, S., Gurel, E. and Kaya, Z. (2001) Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. *Turkish Journal of Botany* 25: 25-33.
- Iantcheva, A., Vlahova, M., Hanhtrinh, T., Brown, S. C., Slater, A., Elliott, M. C. and Atanassov, A. (2001) Assessment of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid annual *Medicago*. *Plant Science* 160: 621-627.
- Ivanova, A., Velcheva, M., Denchev, P., Atanassov, A. and Vanonckelen, H. A. (1994) Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Plant Physiology* 92: 85-89.
- Jimenez, V. M. and Bangerth, F. (2001) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum* 111: 389-395.
- Jimenez, V. M. and Thomas, C. (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Monographs* 2: 103-118.
- Lakshmanan, P. and Taji, A. (2000) Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology* 2: 136-148.
- Leroy, X. J., Leon, K., Charles, G. and Branchard, M. (2000) Culiflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. *Plant Cell Reports* 19: 1102-1107.
- Luica, A., Felix, F. I., Federizzi, L. C., Lange, C. E. and Handel, L. (1997) Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics* 15: 473-479.
- Mitten, D. H., Sato, S. J. and Skokut, T. A. (1984) *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm source. *Crop Science* 24: 943-945.
- Mohammadzadeh, F., Monirifar, H., Saba, J., Valizadeh, M., Razbanhaghghi, A., Malekizanjani, B., Barghi, M. and Tarhriz, V. (2011) Genetic variation among Iranian alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations based on RAPD markers. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 18: 93-104.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Newman, P. O., Krishnaraj, S. and Saxena, P. K. (1996) Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. *International Journal of Plant Sciences* 157: 554-560.
- Pasternak, T., Miscolzi, P., Ayaydin, F., Dudits, T. and Feher, A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-driven cells of alfalfa.

- Journal of Plant Growth Regulation 32: 129-141.
- Perrin, M., Gertz, C. and Masson, J. E. (2004) High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19 grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science* 167: 1343-1349.
- Petolescu, C. and Nedelea, G. (2009) Genetic diversity analysis of the *in vitro* regenerated alfalfa plants using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Romanian Biotechnological Letters* 14: 4882-4886.
- Piccioni, E., Rosellini, D., Falcinelli, M. and Standardi, A. (1996) Micropropagation of mother plants of lucerne (*Medicago sativa* L.) for somatic embryogenesis. *Euphytica* 89: 193-200.
- Radhika, K., Sujatha, M. and Rao, N. T. (2006) Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. *Biologia Plantarum* 50: 174-179.
- Rahnama, H. and Takavar, S. (2012) Plant regeneration from mature embryo derived callus of corn (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Biology* 13: 71-84 (in Persian).
- Rashid, B., Husnain, T. and Riazuddin, S. (2004) *In vitro* shoot tip culture of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Pakistan Journal of Botany* 36: 817-823.
- Shao, C. Y., Russinova, E., Iantcheva, A., Atanassov, A., McCormac, A., Chen, D. F., Elliott, M. C. and Slater, A. (2000) Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago sativa* L.) via direct somatic embryogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 155-166.
- Stuart, D. A., Nelson, J., Strickland, S. G. and Nichol J. W. (1985) Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. In: *Tissue culture in forestry and agriculture* (Eds. Henke, R. R., Hughes, K. W., Constanin M. P. and Hollaender, A.) 59-73. Plenum, New York.
- Tesfaye, M., Kevin, A. T., Silverstein, B., Bruna, B. D., Bucciarelli, B., Samac, D. A and Vance, P. V. (2006) The affymetrix medicago geneChip® array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Functional Plant Biology* 33: 783-788.
- Turgut-Kara, N. and Sule, A. (2008) *In vitro* plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *African Journal of Biotechnology* 7: 1250-1255.
- Vlahova, M., Stefanova, G., Petkov, P., Barbulova, A., Petkova, D., Kalushkov, P. and Atanassov, A. (2005) Genetic modification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) for quality improvement and production of novel compounds. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 19: 56-62.
- Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, A., Malboobi, M. and Habashi, A. (2009) Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 7: 567-572.
- Zhao, J., Zhu, W. H. and Hu, Q. (2001) Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. *Journal of Plant Growth Regulation* 33: 43-49.

اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر رنگیزه‌های فتوستنتزی و مقدار پرولین در گیاه توتون وارسته کوکر ۳۴۷

محمد رضا تیزهوش جلالی^۱، جنت سرمد^{۱*}، اکبر نورسته‌نیا^۱، محسن زواره^۲ و مهیار مشتاقی^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۳ بخش آگرونومی، مرکز تحقیقات توتون رشت، شرکت دخانیات ایران، رشت، ایران

چکیده

جاسمونیک اسید و استر متیله آن (متیل جاسمونات) یکی از تنظیم‌کننده‌های طبیعی رشد گیاهی است که به طور گسترده در گیاهان وجود دارد. در این حاضر، تأثیر غلظت ۳۰ میکرومولار متیل جاسمونات به صورت محلول‌پاشی در مراحل اولیه رشد و در شرایط زیادی یون کلر، بر رنگیزه‌های فتوستنتزی و پرولین در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) وارسته کوکر ۳۴۷ بررسی شد. بدین منظور در سال زراعی ۱۳۸۹-۱۳۹۰ آزمایشی در مرکز تحقیقات توتون رشت به صورت طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلدانی خارج از گلخانه اجرا شد. پس از انتقال گیاهچه‌های یکنواخت به گلدان‌ها، گیاهان در مرحله رشد سریع با سه سطح یون کلر (۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) حاصل از CaCl_2 در حضور و عدم حضور متیل جاسمونات، در ۴ تکرار به مدت چهار هفته آبیاری شدند. تحلیل داده‌ها نشان داد که با افزایش یون کلر آب آبیاری تا تیمار ۳۰۰، تجمع کلر و کلسیم در برگ‌ها به طور معنی‌داری افزایش و میزان رنگیزه‌های فتوستنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل) و پرولین کاهش یافت. کاربرد خارجی متیل جاسمونات (۳۰ میکرومولار) موجب افزایش معنی‌دار میزان رنگیزه‌های فتوستنتزی در کلیه تیمارها و پرولین در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلر گردید. به نظر می‌رسد کاربرد خارجی متیل جاسمونات (۳۰ میکرومولار) می‌تواند آسیب‌های حاصل از غلظت‌های بالای یون کلر را در گیاه توتون بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، توتون، رنگیزه‌های فتوستنتزی، متیل جاسمونات، یون کلر

مقدمه

شود (Munns and Tester, 2008). تنش شوری با افزایش پتانسیل اسمزی محلول خاک، موجب اختلال در تمامی فرآیندهای اصلی سلولی مانند: فتوستنتز، ساخت پروتئین و انرژی می‌شود (Hajlaoui *et al.*,

اصطلاح تنش شوری زمانی اطلاق می‌شود که غلظت بالایی از یون‌ها نظیر: سدیم، کلر، کربنات، منیزیم، سولفات و بورات سبب کاهش رشد گیاهان

گیاه اغلب در کوتاه مدت تحمل می‌شود اما در بلند مدت باعث کاهش رشد و تقسیم سلولی و به دنبال آن تولید برگ‌های کوچک و ضخیم می‌گردد (Zamani, 2010). غلظت کلر بیش از ۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه توتون موجب کاهش رشد، کیفیت و ارزش تجاری برگ و ایجاد خصوصیات نامطلوب در برگ‌های خشک می‌شود (Xu et al., 2000).

امروزه کاربرد برخی تنظیم‌کننده‌های رشد مانند جاسمونیک اسید یا مشتق متیله آن به منظور بهبود رشد گیاهان در شرایط تنش، گسترش یافته است. استفاده از جاسمونیک اسید خارجی می‌تواند در گیاه آثار فیزیولوژیک متعددی ایجاد کند (Munns et al., 2006).

شوری، مقدار کلروفیل گیاه را کاهش می‌دهد. کاهش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید در شرایط تنش شوری در گیاه گوجه‌فرنگی توسط Usha و Singh (۲۰۰۳) و Horvath و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است. مطالعات نشان داده است که افزایش متیل جاسمونات خارجی در ریشه گیاه برنج، موجب مقابله با آثار زیان بار شوری حاصل از کلرید سدیم بر فتوسنتز و رشد در این گیاهان می‌گردد (Chavoushi et al., 2010). افزایش شوری، مقدار رنگیزه‌های کلروفیلی در گیاه نخود را نیز کاهش می‌دهد و استفاده از متیل جاسمونات خارجی موجب افزایش محتوای کلروفیل‌ها در این گیاهان شده است (Kumari et al., 2006). همچنین Chavoushi و همکاران (۲۰۱۰) با تحقیق روی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) اعلام کردند که حضور متیل جاسمونات موجب افزایش رنگیزه‌های فلاونوئیدی و آنتوسیانینی در این گیاه می‌گردد.

(2009). گیاه توتون (*Nicotiana tabacum L.*) از تیره Solanaceae، گیاهی چند ساله است. با وجود این که توتون می‌تواند در محدوده وسیعی از انواع خاک‌ها از شنی سبک تا رسی سنگین کشت شود با این حال برای تولید محصول با کیفیت، هر نوع توتون به خاک مخصوصی نیاز دارد. توتون در خاک‌های خیلی اسیدی و خیلی قلیایی محصول مطلوبی نمی‌دهد و بهترین اسیدیته برای کشت توتون محدوده ۵/۵ تا ۶ است. تهویه مناسب و ظرفیت نگهداری رطوبت کافی در خاک، از ویژگی‌های خاک‌های بافت شنی و لومی-شنی است که در کشت توتون گرمخانه‌ای به کار می‌رود. به طور کلی، خاک، کیفیت آب آبیاری، عناصر غذایی و آب و هوا عوامل اصلی تعیین‌کننده کیفیت محصول توتون به شمار می‌روند (Denduangboripant et al., 2010).

کلر یک عنصر هالوژن در گروه چهارم جدول تناوبی، با عدد اتمی ۱۷ و میانگین جرم اتمی ۳۵/۵ است و تنها حالت اکسایش پایدار آن به صورت آنیون تک ظرفیتی است. کلر ماده غذایی کم مصرف ضروری برای بیشتر گیاهان است و حداقل نیاز به آن برای رشد محصول ۱ گرم بر گیلوگرم وزن خشک گیاه پیشنهاد شده است (Marschner, 2012). به طور کلی، این مقدار کلر از طریق بارندگی تأمین می‌شود و گیاهان با کمبود کلر به ندرت در کشاورزی یا طبیعت مشاهده می‌شوند. اگرچه غلظت زیاد کلر در بافت می‌تواند برای گیاهان زراعی سمی باشد و کشاورزی را در مناطق شور محدود کند، اما تأثیر یون کلر بر رشد، به نوع گیاه بستگی دارد. گیاه توتون کلر دوست است و آن را به سرعت و به مقدار زیاد در خود انباشته می‌کند. افزایش این یون در

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال زراعی ۱۳۸۹-۱۳۹۰ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در مرکز تحقیقات توتون رشت (طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۳۱ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۳۷ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۰ متر از سطح دریای آزاد) اجرا شد. بر اساس مطالعه Sadrzamani و همکاران (۲۰۱۱) آستانه تحمل گیاه توتون رقم کوکر ۳۴۷، غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر کلر آب آبیاری تعیین و به عنوان غلظت پایه تنش یون کلر گزارش گردید. در این راستا، تیمارهای آزمایشی پژوهش حاضر شامل سه سطح کلر آب آبیاری (۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) حاصل از کلرید کلسیم (CaCl_2) و بر اساس تحقیق Jang و همکاران (۲۰۰۸) دو سطح متیل جاسمونات (صفر و ۳۰ میکرو مولار) در نظر گرفته شد. در این آزمایش، از گیاه توتون وارپته کوکر ۳۴۷ استفاده شد. این وارپته که متعلق به توتون‌های درشت برگ تیپ غربی (ویرجینیا) است، به عنوان یک رقم تجاری مناسب و منطبق با شرایط آب و هوایی در استان‌های شمالی ایران کشت می‌گردد. در نیمه اسفند ماه ۱۳۸۹ بذر توتون در سینی‌های کشت مخصوص، محتوی خاک کاشته شد و به خزانه شناور مرکز تحقیقات توتون رشت منتقل شد. سپس گلدان‌هایی پلاستیکی با گنجایش ۲۵ کیلوگرم خاک انتخاب و کف آنها سوراخ شد. به منظور ایجاد زهکش مناسب، به ارتفاع ۵ تا ۱۰ سانتی متر سنگ ریزه در هر گلدان ریخته شد و بقیه حجم گلدان با خاک مزرعه مرکز تحقیقات (جدول ۱) و پرلیت به نسبت ۴ به ۱ پر شد.

Yildiz-Aktas و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده کردند که در گیاه کتان مقاوم به خشکی، سطح کاروتنوئیدها در مقایسه با گیاه کتان حساس به خشکی بالاتر است. به نظر می‌رسد متیل جاسمونات با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و از بین بردن رادیکال‌های آزاد اثر تخریبی تنش را کاهش می‌دهد (Wang, 1999). پرولین نیز به عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدر رفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، جلوگیری از تجزیه پروتئین‌های مختلف، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و حفظ سامانه‌های غشایی می‌شود (Kafi et al., 2012).

Fedina و Benderliev (۲۰۰۰) کاربرد خارجی متیل جاسمونات را تحت تنش‌های مختلف از جمله شوری بررسی و مشاهده کردند که متیل جاسمونات خارجی با القای آنزیم سنتز کننده پرولین باعث افزایش مقاومت در گیاه می‌گردد.

در سال‌های اخیر غلظت بالای یون کلر در خاک و آب آبیاری موجب مشکلات عمده در صنعت توتون و کاهش کیفیت تجاری برگ‌های این گیاه شده است. بنابراین، یافتن راه‌های مناسب برای کاهش جذب کلر در این گیاه بسیار ضروری است. از آن جا که اطلاعات مدون و مستند چندانی درباره نقش بالقوه یون کلر و آثار متیل جاسمونات در فیزیولوژی و کاهش جذب این یون در گیاهان زراعی از جمله گیاه توتون وجود نداشت، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر غلظت ۳۰ میکرومولار متیل جاسمونات و غلظت‌های بالای یون کلر بر جذب و تجمع عناصر کلر و کلسیم، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پرولین در برگ‌های گیاه توتون وارپته کوکر ۳۴۷ انجام شد.

جدول ۱- نتایج بررسی های فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک محل اجرای طرح

عمق خاک (سانتی متر)	۳۰-۰
هدایت الکتریکی خاک (ds/m)	۲/۲۳
بافت خاک	لومی-شنی
آهک	۲/۲۵
سیلت (درصد)	۱۳
شن (درصد)	۱۸
رس (درصد)	۶۹
اسیدیته	۵/۳
کربن آلی (درصد)	۰/۹۴
نیترژن (درصد)	۰/۱۶۷
پتاسیم (ppm)	۶۱۹
فسفر (ppm)	۳۸/۲
کلسیم (میلی اکی والان بر لیتر)	۴/۶
منیزیم (میلی اکی والان بر لیتر)	۱/۴
کلر (میلی اکی والان بر لیتر)	۰/۸

CaCl₂، از قسمت میانه و بین رگبرگ های برگ یازدهم بوته ها (از برگ های میانی)، دیسک برگ تهیه و پس از پیچیدن آنها در فویل، در نیتروژن مایع حمل و به فریزر ۷۰- درجه سلسیوس منتقل شد. باقیمانده برگ ها برای تهیه پودر برگ به آون منتقل گردید.

سنجش یون کلسیم: در این سنجش از روش

تیتراسیون با نیترات نقره استفاده شد (Emami, 1996). به این منظور ۰/۵ گرم پودر برگ توتون همراه با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۰/۵ ساعت در بن ماری قرار گرفت و سپس صاف شد. ۱۰ میلی لیتر از این عصاره همراه با ۴۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر کرومات پتاسیم به عنوان معرف در یک ارلن ریخته شد. از یک ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر کرومات پتاسیم به عنوان شاهد استفاده شد. سپس با نیترات نقره ۰/۰۲۵ نرمال تیتراژ شدند. به طوری که رنگ محلول از زرد روشن به نارنجی متمایل به قهوه ای تبدیل گردد. درصد کلر در گرم نمونه برگ خشک از رابطه ۱ محاسبه گردید، $V_0 =$ میزان تیتراژ برای محلول شاهد به میلی لیتر و $V_1 =$ میزان تیتراژ برای نمونه به میلی لیتر.

$$\text{رابطه ۱: } [(V_1 - V_0) \times 35.5 / 40 \times 95] \times 100$$

سنجش یون کلسیم: با روش سوزاندن خشک و

ترکیب با کلریدریک اسید انجام شد (Emami, 1996). در این روش، ۲ گرم نمونه برگ خشک در کوره به مدت ۴ ساعت در حرارت ۵۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه خاکسترها با اندکی آب خیسانده و با شیشه ساعت پوشانده شدند. ۱۰ میلی لیتر کلریدریک اسید ۲ مولار به آن اضافه شد. محتویات پس از گذشتن از کاغذ صافی به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ۱۰ میلی لیتر از این

در اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ نشاهای سالم و یکنواخت به ارتفاع ۱۲ سانتی متر انتخاب شدند و در گلدان هایی که به فاصله یک متر از هم در خاک قرار داده شده بودند، کاشته شدند. نشاها به مدت چهار هفته و در هر هفته سه بار تنها با آب مقطر آبیاری شدند تا به خوبی در خاک استقرار یافته و وارد مرحله رشد سریع شوند. پس از آن، آبیاری با محلول CaCl₂ سه مرتبه در هفته با غلظت های کلر ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۴ هفته انجام شد. متیل جاسمونات در سه مرحله روی برگ ها افشانه شد (مرحله ۱: یک هفته پس از انتقال نشاها به گلدان ها؛ مرحله ۲: در هفته سوم پس از اعمال تیمار کلر در مرحله رسیدگی برگ های پایینی؛ مرحله ۳: یک هفته پیش از رسیدگی و برداشت برگ های میانی). یک هفته پس از آخرین آبیاری با

است.

$$\text{Chl.a} = (12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}) \times V/A \quad \text{رابطه ۳:}$$

$$\text{Chl.b} = (21.50 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}) \times V/A \quad \text{رابطه ۴:}$$

$$\text{Chl.T} = \text{Chl.a} + \text{Chl.b} \quad \text{رابطه ۵:}$$

$$\text{Car.T} = (1000 A_{470} - 1.82 \text{Chl.a} - 85.02 \text{Chl.b}) / (198 \times V/A) \quad \text{رابطه ۶:}$$

سنجش پرولین: از روش Bates و همکاران

(۱۹۷۳) استفاده شد. به این منظور ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در ۵ میلی لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ساییده و سپس با کاغذ واتمن شماره دو صاف شد. ۲ میلی لیتر از آن در لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین (۱/۲۵) گرم نین هیدرین + ۲ میلی لیتر فسفریک اسید) و ۲ میلی لیتر استیک اسید خالص اضافه شد. محلول‌های حاصل، درون بن ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند. سپس به مدت نیم ساعت در حمام یخ گذاشته شدند. در ادامه، ۶ میلی لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد. لوله‌ها کاملاً تکان داده شدند و به مدت ۲۰ ثانیه ثابت ماندند تا دو لایه مجزا تشکیل گردد. در پایان، جذب لایه رنگی بالایی (پرولین محلول در تولوئن) در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم بر گرم تعیین گردید. داده‌های با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. شکل‌ها با نرم افزار Excel رسم شدند. شایان ذکر است که غلظت‌های کلر آب آبیاری استفاده شده و آثار متیل جاسمونات بر آن در پژوهش حاضر برای نخستین بار با همکاری مرکز

عصاره در ارلن ۲۵۰ با آب مقطر به حجم رسانده شد. ۸ میلی لیتر سود ۴ نرمال و کمی پودر معرف پاتون ریدر (H.H.S.N.N.A) به آن افزوده شد تا رنگ محلول، قرمز مایل به صورتی شود. محلول حاصل با محلول استاندارد یک پنجاهم نرمال EDTA تا تغییر رنگ از قرمز صورتی به آبی خالص تیترا شد. درصد کلسیم در گرم نمونه برگ خشک از رابطه ۲ محاسبه گردید. $a =$ حجم نمونه پی پت شده به میلی لیتر، $x =$ حجم EDTA مصرفی برای تیتراسیون به میلی لیتر، $v =$ حجم محلول حاصل از انحلال خاکستر به میلی لیتر، $m =$ وزن نمونه گیاه خاکستر شده به گرم، $D.M =$ درصد ماده خشک.

$$\text{رابطه ۲:} \quad (x \times v \times 100) / (a \times m \times 25 \times D.M)$$

سنجش کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها: از روش

Lichtenthaler (۱۹۹۴) استفاده شد. بدین منظور یک دیسک برگی از هر بوته تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در پنج میلی لیتر استون ۸۰ درصد در شرایط سرما و تاریکی قرار داده و سپس در هاون چینی ساییده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل KD2، شرکت Sigma، آلمان) گردید. عصاره استونی شفاف جدا شد و مقدار جذب محلول در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶/۸ و ۶۶۳/۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل M501، شرکت Camspec، انگلستان) در مقابل نمونه شاهد خوانده شد. مقدار کلروفیل a (Chl.a)، کلروفیل b (Chl.b)، کلروفیل کل (Chl.T) و کاروتنوئیدها (Car.t) از رابطه‌های ۳ تا ۶ بر حسب میکروگرم در سانتی متر مربع سطح برگ محاسبه شد، $V =$ حجم استون مورد استفاده به میلی لیتر و $A =$ سطح دیسک برداشت شده از برگ به سانتی متر مربع

آب آبیاری تا تیمار ۳۰۰ میلی گرم در لیتر در شرایط عدم حضور متیل جاسمونات، تجمع کلسیم در برگ‌های میانی را به طور معنی‌داری افزایش داده است. کاربرد متیل جاسمونات خارجی تجمع کلسیم در برگ‌ها را نسبت به تیمارهای بدون متیل جاسمونات فقط در تیمار کلر ۳۰۰ کاهش داد (شکل ۲).

بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) برگ‌های میانی با سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت کلر آب آبیاری در تیمار ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر کلر و بدون حضور متیل جاسمونات، مقدار کلروفیل‌ها کاهش معنی‌داری یافت و کاربرد متیل جاسمونات به شکل افشانه روی برگ گیاهان توتون، موجب افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های کلروفیلی شد. بیشترین مقدار رنگیزه‌های کلروفیلی در تیمار کلر ۵۰ و در حضور متیل جاسمونات و کمترین آن در تیمار کلر ۳۰۰ و عدم حضور متیل جاسمونات دیده شد (شکل ۳). نمودارهای مربوط به سنجش کلروفیل a و کلروفیل b به دلیل تبعیت از الگوی کلروفیل کل نشان داده نشده است.

بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر محتوای کاروتنوئید کل برگ‌های میانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. میانگین داده‌ها نشان داد که افزایش کلر آب آبیاری تا میزان ۳۰۰ در مقدار کاروتنوئید کل تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد. کاربرد متیل جاسمونات خارجی مقدار کاروتنوئیدها را تنها در تیمار کلر ۵۰ با سطح معنی‌دار یک درصد افزایش داد (شکل ۴).

تحقیقات توتون رشت توسط نگارندگان انجام و گزارش می‌گردد.

Salimi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر متیل جاسمونات خارجی بر شوری ناشی از کلرید سدیم در گیاه بابونه آلمانی گزارش کردند که افزایش شوری از ۲/۱ تا ۱۴ دسی زیمنس بر متر تغییر معنی‌داری در میزان پرولین ایجاد نکرد. در حالی که حضور متیل جاسمونات خارجی با غلظت ۷۵ میکرومولار موجب افزایش پرولین در غلظت‌های مختلف شوری شده است.

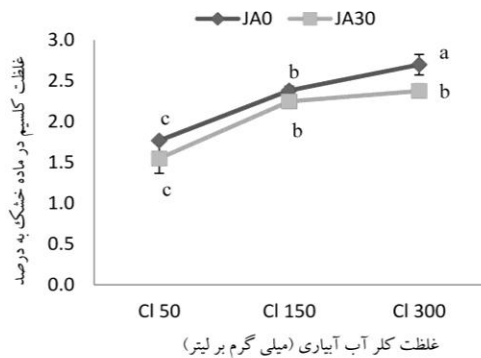
بر اساس پژوهش Jang و همکاران (۲۰۰۸) افزودن کلرید سدیم به مقدار ۵۰ میلی گرم در لیتر در گیاه توتون، میزان پرولین را افزایش و فتوسنتز را کاهش داد و محلول‌پاشی متیل جاسمونات به میزان ۳۰ میکرومولار موجب کاهش جزئی پرولین و افزایش فتوسنتز شد.

نتایج

بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر غلظت کلر برگ‌های میانی گیاه توتون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در عدم حضور متیل جاسمونات با افزایش کلر آب آبیاری، تجمع کلر در برگ به طور معنی‌داری افزایش یافت. کاربرد متیل جاسمونات خارجی موجب کاهش معنی‌دار میزان تجمع کلر برگ‌های میانی در تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ به ترتیب به میزان ۵۵ و ۷ درصد شد (شکل ۱).

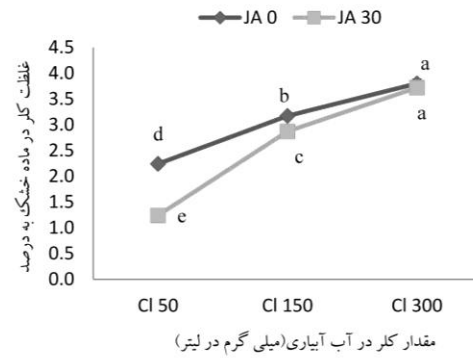
بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر غلظت کلسیم برگ‌های میانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که افزایش کلر

آن در تیمار کلر ۳۰۰ به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۵). کاربرد متیل جاسمونات خارجی موجب کاهش معنی‌دار میزان پرولین در تیمارهای کلر ۵۰ و ۱۵۰ کلر و افزایش معنی‌دار آن در تیمار کلر ۳۰۰ در مقایسه با تیمارهای کلر بدون متیل جاسمونات گردید.

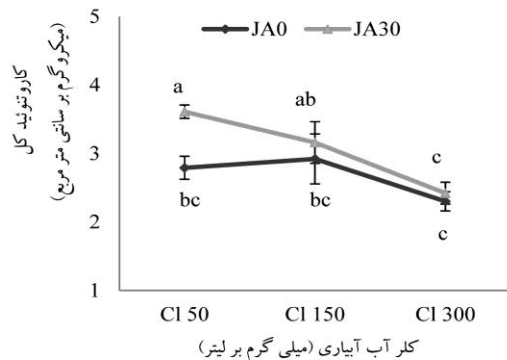


شکل ۲- اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های کلر آب آبیاری بر غلظت کلسیم در برگ‌های میانی توتون. مقادیر میانگین ۴ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است ($P < 0.01$).

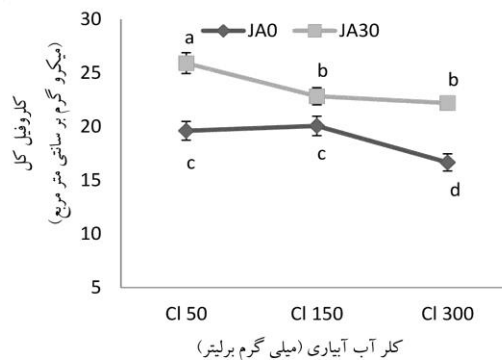
بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های مختلف یون کلر بر محتوای پرولین برگ‌های میانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با وجود محتوای بالای پرولین برگ‌ها در تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ کلر، مقدار



شکل ۱- اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های کلر آب آبیاری بر غلظت کلسیم در برگ‌های میانی توتون. مقادیر میانگین ۴ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است ($P < 0.01$).



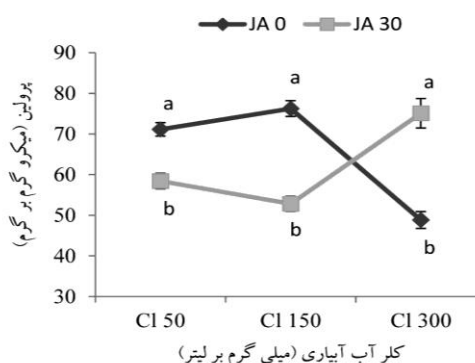
شکل ۴- اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های کلر آب آبیاری بر محتوای کاروتنوئید کل در برگ‌های میانی توتون. مقادیر میانگین ۴ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است ($P < 0.01$).



شکل ۳- اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های کلر آب آبیاری بر محتوای کلروفیل کل در برگ‌های میانی توتون. مقادیر میانگین ۴ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است ($P < 0.01$).

کلسیم در تعدیل آثار مخرب کلرید سدیم (NaCl) به وسیله مهار جذب سدیم نشان داده شده است (Chin *et al.*, 1991). نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت کلر آب آبیاری تا تیمار ۳۰۰ میلی گرم در لیتر، میزان کلر و کلسیم برگ‌ها به صورت خطی افزایش یافت (شکل‌های ۱ و ۲).

غلظت بالای کلر در خاک شرایط سختی را برای جذب آب توسط ریشه ایجاد می‌کند و موجب بروز نشانه‌های سمیت در گیاه می‌شود. آنیون کلر که توسط ریشه جذب می‌شود علاوه بر رشد، بر کیفیت برگ گیاه توتون نیز بسیار تأثیرگذار است. تجمع زیاد یون کلر در توتون باعث می‌شود که برگ‌ها ترد، شکننده و ضخیم شوند. وجود بیش از ۱ درصد کلر در توتون از موجب کاهش قابلیت اشتعال و کاهش کیفیت توتون می‌شود (Tso, 1990). کلسیم نیز به میزان ۱ تا ۲/۵ درصد موجب بهبود کیفیت برگ توتون می‌گردد در حالی که بیشتر از این مقدار انعطاف‌پذیری توتون را کم و موجب کاهش کیفیت توتون می‌شود (Tso, 1990). Ruiz و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که با افزایش میزان کلرید کلسیم خاک، مقدار این عناصر در برگ گیاه توتون افزایش می‌یابد. در ادامه، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد متیل جاسمونات خارجی، محتوای کلر برگ‌ها را در تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر کلر آب آبیاری به طور معنی‌دار کاهش داد (شکل ۱). انتقال کلر به آوند چوبی مکانیسمی غیرفعال است که توسط کانال‌های آنیونی صورت می‌گیرد و فعالیت این کانال‌ها توسط هورمون آبسزیک اسید تنظیم می‌گردد. به دنبال تنش شوری، انتقال کلر به ساقه و برگ‌ها محدود می‌شود (Gilliham and Tester,



شکل ۵- اثر متیل جاسمونات و غلظت‌های کلر آب آبیاری بر میزان پرولین در برگ‌های میانی توتون. مقادیر میانگین ۴ تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است ($P < 0.01$).

بحث

توتون از معدود گیاهان زراعی غیر خوراکی و یکی از کالاهای تجارت جهانی است که تنها بر اساس استفاده از برگ آن در مقیاس بسیار وسیع در جهان کشت می‌شود. با وجود این که طی ۳۰ سال گذشته در مراکز تحقیقاتی توتون کشور، تعداد زیادی طرح تحقیقاتی در زمینه آب آبیاری انجام شده است تنها تعداد محدودی از آنها در سال‌های اخیر به موضوع کیفیت آب آبیاری به ویژه در رابطه با زیاده یون کلر پرداخته‌اند. جذب کلر اضافی از طریق کود، خاک شور یا آب آبیاری به سرعت کیفیت برگ توتون را کاهش می‌دهد (Tso, 1990). به علت سرعت و مقدار بالای انباشت یون کلر در گیاه توتون، سطح کلر موجود در آب و خاک مورد استفاده در زراعت توتون بسیار مهم ارزیابی می‌شود. در بررسی حاضر، برای بررسی آثار بالقوه یون کلر و کاهش آثار تخریبی یون سدیم بر کیفیت برگ توتون از نمک کلرید کلسیم ($CaCl_2$) برای تأمین یون کلر استفاده شد. توانایی

پراکسیداز به طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد افزایش یافت و کاربرد متیل جاسمونات خارجی با غلظت ۳۰ میکرومولار در سه بار افشانه برگی موجب کاهش آسیب‌های حاصل از تنش اکسیداتیو تنها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر یون کلر گردید. کاروتنوئیدها توسط اکسیژن یکتایی اکسید می‌شوند و می‌توانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهند (Kumari et al., 2006). تیمار با متیل جاسمونات خارجی در شرایط تنش با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌تواند موجب حذف رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهان شود (Wang, 1999).

نتایج نشان داد در حالی که محتوای پرولین برگ‌ها در تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلر بالا بود، با کاربرد متیل جاسمونات خارجی مقدار پرولین برگ‌ها در این تیمارها به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۵). پرولین به عنوان تنظیم‌کننده فشار اسمزی می‌تواند موجب تعدیل تنش شوری در گیاه شود. بر اساس پژوهش‌های Jang و همکاران (۲۰۰۸)، افزودن آب آبیاری به صورت کلرید سدیم و به مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در گیاه توتون، میزان پرولین را افزایش و مقدار فتوسنتز را کاهش می‌دهد و محلول‌پاشی با متیل جاسمونات به میزان ۳۰ میکرومولار موجب کاهش جزئی پرولین و افزایش فتوسنتز می‌شود. Salimi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر متیل جاسمونات خارجی بر شوری ناشی از کلرید سدیم در گیاه بابونه آلمانی گزارش کردند که افزایش شوری از ۲/۱ تا ۱۴ دسی زیمنس بر متر تغییر معنی‌داری در میزان پرولین ایجاد نکرد. در حالی که حضور متیل جاسمونات

(2005). با توجه به مشترک بودن بخشی از مسیر عملکرد متیل جاسمونات و آبسزیک اسید و اثرگذاری متیل جاسمونات روی ژن‌هایی که آبسزیک اسید را کد می‌کنند (Marschner, 2012)، احتمالاً متیل جاسمونات خارجی با اثر بر بیوسنتز آبسزیک اسید و به دنبال آن اثر بر کانال‌های آنیونی موجب کاهش انتقال کلر به اندام‌های هوایی و کاهش محتوای کلر برگ‌ها شده است.

نتایج حاصل از تحلیل داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت کلر آب آبیاری تا تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، رنگیزه‌های کلروفیلی از جمله کلروفیل کل کاهش یافت. در حالی که کاربرد متیل جاسمونات خارجی با غلظت ۳۰ میکرومولار میزان رنگیزه‌ها و کلروفیل کل را افزایش داد (شکل ۳). کاهش رنگیزه‌های کلروفیلی تحت تنش یونی می‌تواند به علت تخریب ساختمان کلروپلاست، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آنها با اکسیژن منفرد، تخریب پیش‌ماده سنتز کلروفیل و ممانعت از بیوسنتز کلروفیل جدید باشد (Neocleous and Vasilakakis, 2007). با این وجود، کاربرد متیل جاسمونات خارجی می‌تواند با کاهش آثار مخرب تنش شوری موجب افزایش سنتز کلروفیل شود (Jang et al., 2008). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد متیل جاسمونات خارجی (۳۰ میکرومولار) موجب افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های کاروتنوئیدی در تیمار کلر ۵۰ شده است (شکل ۴). Divband (۲۰۱۳) در بررسی اثر متیل جاسمونات بر برخی وقایع بیوشیمیایی توتون وارپته کوکر ۳۴۷ در پاسخ به غلظت‌های ۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر یون کلر نشان داد که محتوای مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم

حالی که رنگیزه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی به ترتیب در تمامی تیمارهای کلر و در تیمار کلر ۵۰ افزایش یافتند. به نظر می‌رسد این نتایج در ارتباط با بخشی از نقش بهبود دهندگی متیل جاسمونات در تنش حاصل از غلظت‌های بالای یون کلر در گیاه توتون رقم کوکر ۳۴۷ باشد.

خارجی با غلظت ۷۵ میکرومولار موجب افزایش پرولین در غلظت‌های مختلف شوری شده است. کاهش و افزایش معنی‌دار مقدار پرولین برگ‌ها در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلر به ترتیب در عدم حضور و حضور متیل جاسمونات (شکل ۵) شاید به واسطه سمیت یونی ناشی از غلظت بالای یون کلر رخ داده باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب سپاس خود را از ریاست مرکز تحقیقات توتون رشت به خاطر تأمین بخشی از منابع مالی این پژوهش اعلام می‌نمایند.

جمع‌بندی نهایی

با کاربرد خارجی متیل جاسمونات (۳۰ میکرومولار) محتوای کلر و پرولین برگ‌ها در تیمارهای ۵۰ و ۱۵۰ به طور معنی‌داری کاهش یافت در

منابع

- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-208.
- Chavoushi, M., Arvin, M. J. and Kalantari, K. H. (2010) Effect of jasmonate on photosynthetic pigments, protein content, Na^+ , K^+ ions and some growth parameters in *Carthamus tinctorios* under salinity stress. *Iranian Journal of Biology* 23: 397-408 (in Persian).
- Chin, C. T., Shetty, K., Mortimer, M. and Oser, C. S. (1991) Calcium induced salt tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain C1204b. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 83(2): 219-224.
- Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasart, W. and Panda, S. (2010) Determination of local tobacco cultivars using ISSR molecular markers. *Journal of the Science faculty of Chiang Mai University* 37: 293-303.
- Divband, S. M. (2013) A study on the effect of methyl jasmonate on some biochemical events in tobacco (Cooker 347 Cultivar) in response to different chlorid concentrations. MSc thesis. University of Guilan, Rasht, Iran (in Persian).
- Emami, A. (1996) Methods of plant analysis. Soil and Water Agricultural Research Institute, Tehran (in Persian).
- Fedina, I. S. and Benderliev, K. M. (2000) Response of *Secundaria incrassatulus* to salt stress as affected by methyl jasmonate. *Biologia Plantarum* 43(4): 625-627.
- Gilliham, M. and Tester, M. (2005) The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Journal of Plant Physiology* 137: 819-828.
- Hajlaoui, H., El Ayeb, N., Garrec, J. P. and Denden, M. (2009) Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissues senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. *Industrial Crops and Products* 31: 122-130.
- Horvath, E., Szalai, G. and Janda, T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid

- signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 290-300.
- Jang, S. W., Lee, I. G., Cha, K. H., Shin, S. K. and Jo, C. J. (2008) Effects of methyl jasmonate application on the growth of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) against salinity stress. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, France (Coresta)
- Kafi, M., Borzoee, A., Salehi, M., Kamadi, A., Masoumi, A. and Nabati, J. (2012) Physiology of environmental stresses in plants. 1st edition. Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad (in Persian).
- Kumari, G. J., Reddy, A. M., Naik, S. T., Kumar, S. G., Prasanthi, J., Srirangayakulu, G., Reddy, P. C. and Sudhakar, Ch. (2006) Jasmonic acid induced change in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum* 50: 219-226.
- Lichtenthaler, K. H. (1994) Chlorophyll and carotenoids of photosynthetic biomembrances. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Marschner, H. (2012) Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd edition, Academic Press, San Diego.
- Munns, R. and Tester, T. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* 59: 651-681.
- Munns, R., James, R. A. and Läuchli, A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57(5): 1025-1043.
- Neocleous, D. and Vasilakakis, M. (2007) Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. Autumn Bliss). *Scientia Horticulturae* 112: 282-289.
- Ruiz, D., Martinez, V. and Creda, A. (1997) Citrus response to salinity: growth and nutrient uptake. *Tree Physiology* 17: 141-150.
- Sadrzamani, K. (2011) The survey of growth indices and mineral uptake in Tobacco cv. Cooker 347 under chloride anion concentration. MSc thesis, University of Guilan, Rasht, Iran (in Persian).
- Salimi, F., Shekari, F., Azimi, M. R. and Zangani, E. (2011) The role of methyl jasmonate and salinity stress on some physiological characteristics of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). 1st National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies (MAST), Zanjan Iran (in Persian).
- Singh, B. and Usha, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 39: 137-141.
- Tso, T. C. (1990) Production, physiology and biochemistry of tobacco plant. Institute of International Development and Education in Agricultural and Life Sciences, Inc. Beltsville, Maryland.
- Wang, S. Y. (1999) Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *Journal of Plant Growth Regulation* 18: 127-134.
- Xu, G., Magen, H., Tarchitzky, J. and Kafkafi, U. (2000) Advances in chloride nutrition of plants. *Advances in Agronomy* 68: 97-150.
- Yildiz-Aktas, L., Dagnon, S., Gurel, A., Gesheva, E. and Edreva, A. (2009) Drought tolerance in cotton: involvement of non-enzymatic ROS-scavenging compounds. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 247-253.
- Zamani, P. (2010) Tobacco, cultivation and processing. 1st edition. Behandishan Publications, Iranian Tobacco Company, Tehran.

تأثیر محلول پاشی عنصر روی و هورمون اکسین بر تغییرات هورمونی و رشد گیاه ذرت (*Zea mays L.*)

بهنام زند^۱، علی سروش‌زاده^{۱*}، فائزه قناتی^۲ و فؤاد مرادی^۳

^۱ گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، کرج، ایران

^۲ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ بخش تحقیقات فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر محلول پاشی عنصر روی و تنظیم‌کننده رشد اکسین (ایندول بوتریک اسید) بر غلظت دو هورمون اکسین و آبسزیک اسید در دو بخش هوایی و ریشه گیاه ذرت انجام شد. آزمایش در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و هشت تیمار محلول پاشی در مرحله رشد رویشی (شامل ترکیبات مختلف عنصر روی و تنظیم‌کننده رشد اکسین) در سال ۱۳۸۵ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی ورامین به اجرا درآمد. نتایج نشان داد که نوع ترکیبات عنصر روی و تنظیم‌کننده اکسین موجب افزایش غلظت هورمون‌های اکسین و آبسزیک اسید در هر دو بخش هوایی و ریشه شد. همچنین وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی افزایش یافت. از نتایج مهم این تحقیق این است که در اثر تیمارهای محلول پاشی، تغییرات غلظت دو هورمون اکسین و آبسزیک اسید در بخش هوایی گیاه (برگ‌ها) به طور موازی صورت گرفت. مشابه این حالت در غلظت دو هورمون در ریشه با ضریب همبستگی پایین‌تر و غیرمعنی‌دار نیز مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: وزن خشک ریشه، طول ریشه، وزن خشک بخش هوایی، نسبت هورمون‌ها

مقدمه

روی است (Malakouti and Tehrani, 2001). میزان

شدت واکنش گیاهان به شرایط کمبود عنصر روی بر حسب جنس، گونه و حتی رقم گیاه متفاوت است و در میان گیاهان زراعی به طور مشخص برنج، ذرت و لوبیا به عنوان حساس‌ترین گیاهان به کمبود این عنصر شناخته شده‌اند (Alloway, 2004). در مطالعه‌ای در

عنصر روی یکی از عناصر ضروری است که کمبود آن در ایران عمدتاً ناشی از آهکی بودن خاک‌های زراعی، اسیدیته بالا، حضور بی‌کربنات فراوان در آب‌های آبیاری، مصرف زیاد و بیش از نیاز کودهای فسفاته و عدم رواج مصرف کودهای محتوی عنصر

(Gallavotti *et al.*, 2008).

در گیاهان مختلف از جمله ذرت اغلب برای جبران کمبود عنصر روی از ترکیبات سولفات روی ($ZnSO_4$) و کلات روی (Zn EDTA) استفاده می‌شود که در این بین، استفاده از سولفات روی به علت ارزان‌تر بودن در اولویت است (Zand *et al.*, 2010). با وجود این که پیش از این نقش عنصر روی در سازوکار اکسین در گیاهان مختلف گزارش شده است اما در مورد تأثیر محلول‌پاشی ترکیبات مختلف عنصر روی و ماده تنظیم‌کننده رشد اکسین بر تغییرات غلظت اکسین و سایر هورمون‌های و رابطه آنها با رشد گیاهان مطالعات زیادی صورت نگرفته است. به همین علت، در پژوهش حاضر تأثیر محلول‌پاشی سولفات روی ($ZnSO_4$) و کلات روی (Zn EDTA) بر رشد گیاه ذرت و تغییرات غلظت اکسین و آبسزیک اسید مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۸۵ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی ورامین اجرا گردید. بذور گیاه ذرت هیبرید سینگل کراس ۷۰۴، در سطل‌هایی با حجم تقریبی ۴۰ لیتر که محتوی خاک با مشخصات فیزیکی و شیمیایی ذکر شده در جدول ۱ کاشته شدند. سطل‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دامنه درجه حرارتی روز و شب به ترتیب در حدود ۳۰ و ۱۷ درجه سانتیگراد و طول روز به مدت کمتر از ۱۲ ساعت با استفاده از منبع روشنایی مصنوعی (لامپ‌های فلورسنت) نگهداری شدند. آزمایش در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و محلول‌پاشی ۸ تیمار (جدول ۲) از ترکیبات مختلف عنصر روی و ماده تنظیم‌کننده رشد اکسین بود.

شرایط کمبود عنصر روی در دو گیاه ذرت و نخود چنین گزارش شد که فعالیت آنزیم‌های کربوکسیلاسیون از جمله: کربنیک انیدراز، ریبولوز ۱ و ۵-دی فسفات کربوکسیلاز و اکسیژناز (روبیسکو) متوقف شد و میزان کلروفیل و سرعت فتوسنتز در فتوسیستم II و میزان پروتئین کل محدود گردید (Salama *et al.*, 2006). تغذیه گیاه نعلبا غلظت‌های مختلف عنصر روی موجب کاهش میزان مونوترپن‌های اکسیژنه در اسانس این گیاه شد (Zare Dehabadi *et al.*, 2010). از سوی دیگر، این عنصر برای سنتز تریپتوفان که پیش‌ماده هورمون اکسین است مورد نیاز است (Heldt, 2005). هورمون اکسین در گیاه نقش محوری در تنظیم فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک از جمله ریشه‌زایی و به ویژه ریشه‌های فرعی به عهده دارد (Marschner, 1995). بررسی‌های انجام شده اثر هورمون‌های گروه اکسین و عنصر روی بر ریشه‌زایی و رشد بخش هوایی گیاهان را ثابت کرده است. در بررسی آثار کمبود عنصر روی بر نسبت وزن خشک بخش هوایی به ریشه در ژنوتیپ‌های برنج چنین مشخص شد که نسبت وزن خشک بخش هوایی به ریشه، حساس‌ترین شاخص در ارزیابی ژنوتیپ‌ها جهت تحمل به تنش عنصر روی است (Sudhalakshmi *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای دیگر چنین مشاهده شد که اتیلن، رشد ریشه‌ها را از طریق اثر بر بیوسنتز و توزیع اکسین تنظیم می‌نماید (Ruzicka *et al.*, 2007). در بررسی روابط بین انتقال اکسین و تولید انشعابات بخش هوایی در گیاه ذرت چنین نتیجه گرفته شد که تولید این انشعابات در ذرت طی نمو رویشی و زایشی از آثار فعالیت ناقلا در سازوکار حرکت قطبی اکسین است

جدول ۱- مشخصات فیزیکی شیمیایی خاک

عمق (سانتی متر)	۳۰-۰
اسیدیته کل اشباع	۷/۶
هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)	۳
مواد خنثی شونده (T.N.V)	۱۷
کربن آلی (درصد)	۰/۷۲
بافت خاک	لومی-رسی
فسفر (میلی گرم بر کیلو گرم)	۱۰/۶
پتاسیم (میلی گرم بر کیلو گرم)	۳۰۰
آهن (میلی گرم بر کیلو گرم)	۴/۴
منیزیم (میلی گرم بر کیلو گرم)	۱۱/۵
منگنز (میلی گرم بر کیلو گرم)	۰/۴۲
مس (میلی گرم بر کیلو گرم)	۰/۵

جدول ۲- تیمارهای محلول پاشی استفاده شده

شماره تیمار	تیمار محلول پاشی
۱	سولفات روی (۲۵ درصد) + اکسین (۱۰ میلی گرم بر لیتر) + توپین ۲۰
۲	سولفات روی (۲۵ درصد) + توپین ۲۰
۳	کلات روی (۱۵ درصد) + اکسین (۱۰ میلی گرم بر لیتر) + توپین ۲۰
۴	کلات روی (۱۵ درصد) + توپین ۲۰
۵	اکسین (۱۰ میلی گرم بر لیتر) + توپین ۲۰
۶	ماده مومی (مویان) + توپین ۲۰
۷	آب
۸	بدون محلول پاشی

ماده‌ای چسبنده و مومی به نام توپین ۲۰ با نسبت ۰/۵ درصد حجمی استفاده گردید. ماده تنظیم کننده رشد ایندول بوتریک اسید از شرکت سیگما و از الکل جهت تهیه محلول ایندول بوتریک اسید استفاده شد. محلول پاشی تیمارهای مختلف عنصر روی در ساعات اولیه صبح و محلول پاشی تنظیم کننده اکسین در آستانه غروب خورشید و حداقل شدت روشنایی صورت گرفت.

سی روز پس از اعمال تیمارها، بوته‌ها به طور کامل به همراه ریشه از خاک خارج شد. بخش هوایی و ریشه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد در داخل آون تا زمانی که وزن نمونه‌ها ثابت گردد نگهداری شدند. وزن خشک نمونه‌ها به تفکیک اندازه گیری شد.

برای تعیین طول ریشه‌ها از رابطه ۱ استفاده شد (Alizadeh, 2004):

$$0/89 [\text{وزن ریشه‌ها (میلی گرم)}] = \text{طول ریشه‌ها (سانتی متر)}$$

استخراج، خالص سازی و اندازه گیری ایندول

۳- استیک اسید (IAA) و آبسزیک اسید (ABA) (Yokota et al., 1994): برای این منظور از نمونه‌های برگ نگهداری شده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد استفاده گردید. ۲ گرم از نمونه منجمد شده، به وسیله نیتروژن مایع و هاون چینی ساییده شده و در لوله‌های مخروطی ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و پس از افزودن ۴۰ میلی لیتر محلول متانول ۸۰ درصد حاوی ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بوتیلاتد هیدروکسی تولوئن و ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر سدیم آسکوربات به آن، به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا عمل انحلال به خوبی صورت گیرد. سپس نمونه‌ها با

محلول پاشی در سه نوبت با فواصل زمانی دو روز در مرحله ظهور برگ چهاردهم بر اساس تقسیم بندی مراحل فنولوژیک ذرت انجام شد (Hanway, 1971). محلول پاشی عنصر روی برای هر دو نوع ترکیب با غلظت عنصر روی در محلول به صورت ۵ در هزار و غلظت ایندول بوتریک اسید نیز ۱۰ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد. محلول پاشی عنصر روی و ایندول بوتریک اسید به صورت جداگانه توسط دستگاه محلول پاش ۱۰۰ لیتری انجام شد. به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری ترکیبات مختلف محلول پاشی روی بوته‌ها از

نسبت ۵۰:۵۰ در طول موج ۲۵۷ نانومتر، بررسی شد و غلظت IAA و ABA با استفاده از غلظت‌های مختلف استانداردهای این دو ماده (۲۰ و ۴۰ و ۶۰ و ۸۰ و ۱۰۰ میکرومول) تعیین شد. نتایج در نرم‌افزار MSTAT-C تحلیل آماری و برای انجام مقایسه بین میانگین‌ها از روش دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تیمارهای محلول‌پاشی بر کلیه صفات مطالعه شده به غیر از نسبت غلظت اکسین به غلظت آبسزیک اسید برگ، معنی‌دار بود (جدول ۳).

نتایج جدول ۴ نشان داد که بالاترین غلظت عنصر روی ناشی از محلول‌پاشی کلات روی به همراه اکسین و پس از آن محلول‌پاشی کلات روی به تنهایی بود. از نظر میانگین غلظت این عنصر در برگ ترکیب سولفات روی و اکسین و مصرف سولفات روی بدون اکسین با قرار گرفتن در گروه‌بندی جداگانه بالاترین سطوح غلظت را نشان دادند. این نتایج گویای اثربخشی ترکیب کلات روی نسبت به منبع سولفات روی است (جدول ۴).
Salardini و Mojtahedi (۱۹۹۴) مقدار عنصر روی در ماده خشک گیاه ذرت را در حالت کمبود بین ۰-۱۰، در حالت کم ۱۱-۲۰، در حد کافی ۲۱-۷۰ و در مقادیر زیاد بین ۷۱-۱۵۰ قسمت در میلیون گزارش نموده‌اند. بنابراین، با در نظر گرفتن مقادیر فوق چنین مشاهده می‌شود که تیمار محلول‌پاشی کلات روی و اکسین به همراه ماده مومی مویان ۲۰ با میانگین ۲۴/۰۴ قسمت در میلیون سطوح مکفی عنصر روی را در گیاه تأمین نموده

کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و رسوبات باقیمانده روی فیلتر سه بار با محلول استخراج شسته شدند. حدوداً دو سوم متانول نمونه‌ها توسط دستگاه لیوفلایزر (مدل Virtis)، شرکت SP Industries Inc، آمریکا) حذف شد. به محلول باقیمانده به مقدار هم حجم آن بافر فسفات اضافه و اسیدیته آن با هیدروکسید پتاسیم ۰/۲ نرمال در سطح ۸/۵ تنظیم شد. در ادامه، به محلول موجود ۵ تا ۸ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه و مخلوط شد و بخش آلی (اتیل استات) دور ریخته شد. این عمل دو بار دیگر نیز تکرار شد. با توجه به این اصل که اسیدهای ضعیف نظیر IAA و ABA در اسیدیته قلیایی در فاز غیر آلی حل میشوند، در این مرحله ترکیباتی که در اسیدیته قلیایی در فاز آلی حل می‌شوند از محلول حذف گردیدند. سپس، اسیدیته بخش غیر آلی توسط کلریدریک اسید ۰/۲ نرمال در حدود دو تا سه تنظیم شد و دو بار دیگر اتیل استات به محلول باقی مانده اضافه شد. با این تفاوت که این بار در هر دو مرحله اتیل استات در ظرف جداگانه نگهداری شد و بخش غیر آلی دور ریخته شد. شایان ذکر است که با اسیدی شدن محلول، IAA و ABA در فاز آلی حل شده، در این شرایط ترکیبات محلول در فاز غیر آلی حذف شدند. در ادامه، اتیل استات توسط دستگاه لیوفلایزر کاملاً تبخیر شد و باقیمانده بلافاصله در ۲ میلی‌لیتر متانول حل و از فیلتر یک بار مصرف عبور داده شد. محلول به دست آمده توسط دستگاه HPLC (مدل UV Detector 2500Pump 1000، شرکت Knauer، ساخت آلمان) با استفاده از ستون C₁₈ و شدت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در ثانیه با حلال استیک اسید ۰/۱ نرمال و متانول ۸۰ درصد به

محلول پاشی اکسین به تنهایی (تیمار ۵) تأثیر معنی داری بر افزایش غلظت اکسین در برگ نسبت به غلظت اکسین در برگ در گیاهان شاهد (تیمارهای ۶، ۷ و ۸ که به ترتیب محلول پاشی توین ۲۰، آب و بدون محلول پاشی است) نداشت (جدول ۴). غلظت اکسین در برگ گیاهانی که تنها با اکسین محلول پاشی (تیمار ۵) شده بودند مشابه با گیاهانی که با سولفات روی یا کلات روی بدون اکسین محلول پاشی (به ترتیب تیمارهای ۲ و ۴) شده بودند بود. در صورتی که محلول پاشی سولفات روی یا کلات روی همراه با اکسین نسبت به تیمارهای شاهد (تیمارهای ۶، ۷ و ۸ به ترتیب: محلول پاشی توین ۲۰، آب و بدون محلول پاشی) موجب افزایش معنی دار در غلظت اکسین در برگ شد. این امر نشان دهنده تأثیر ترکیبات روی بر سنتز هورمون اکسین است.

است و در مقابل، سه تیمار توین ۲۰، محلول پاشی با آب و عدم محلول پاشی با مقادیر کمتر از ۱۰ قسمت در میلیون عنصر روی گیاه را با کمبود این عنصر مواجه ساخته است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، در خصوص تعیین مرز بین سطوح کمبود، کم، کافی و زیاد بودن عنصر روی منابع مختلف، می توان نتیجه گرفت که ترکیب کلات روی و اکسین به همراه ماده توین ۲۰ از لحاظ تأمین این عنصر در پیکره گیاه در مقایسه با شاهد بسیار کارآمد بوده است. در این رابطه، Marschner (۱۹۹۵) غلظت بحرانی عنصر روی را ۱۵ تا ۲۰ میلی گرم روی در هر کیلوگرم وزن خشک برگ و در مقابل، حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم را طیف سمی این عنصر تعیین نموده است.

بررسی صفات اشاره شده در جدول ۳ نشان داد که

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر محلول پاشی عنصر روی و تنظیم کننده رشد اکسین. **، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح ۱ و ۵ درصد و غیر معنی دار.

میانگین مربعات صفات (MS)											
منبع تغییرات	درجه آزادی	غلظت روی در برگ	آکسین در برگ	آبسزیک اسید در برگ	آکسین در ریشه	آبسزیک اسید در ریشه	نسبت آکسین به آبسزیک اسید در برگ	نسبت آکسین به آبسزیک اسید در ریشه	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	طول ریشه
تکرار	۲	۰/۱۲۴ ^{ns}	۲۵۳۴/۸ ^{ns}	۲۸۹/۹ ^{ns}	۳۸/۱ ^{ns}	۷/۳۹ ^{ns}	۲۰/۹ ^{ns}	۶/۰۸ ^{ns}	۰/۳۳ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۶۵/۲ ^{ns}
محلول پاشی	۷	۹۸/۴۸ ^{**}	۵۱۴۳۳/۸ ^{**}	۴۴۱/۱ ^{**}	۵۲۸۲/۱ ^{**}	۴۲/۰۱ [*]	۲/۲ ^{ns}	۵۷/۷ ^{**}	۰/۰۵۶ ^{ns}	۰/۰۴۴ [*]	۵۳/۷۴ [*]
خطای آزمایش	۱۴	۰/۰۷۶	۵۵۱/۳	۵۶/۹	۲۵/۱	۶/۴	۸/۴	۶/۵	۰/۱۰	۰/۰۰۹	۱۱/۰۲
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱/۹۵	۷/۹۵	۲۵/۱۸	۳/۶۹	۱۸/۲۹	۲۷/۶۱	۲۳/۹۵	۴۴/۷۳	۳۱/۸	۳۱/۹

جدول ۴- میانگین اثر تیمارهای محلول‌پاشی. (۱) سولفات روی + اکسین + توین ۲۰؛ (۲) سولفات روی + توین ۲۰؛ (۳) کلات روی + اکسین + توین ۲۰؛ (۴) کلات روی + توین ۲۰؛ (۵) اکسین + توین ۲۰؛ (۶) توین ۲۰؛ (۷) آب؛ (۸) بدون محلول‌پاشی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

شماره تیمار	غلظت روی (قسمت در میلیون)	غلظت اکسین در برگ (میکرومول بر گرم وزن تازه)	غلظت آبسزیک اسید در برگ (میکرومول بر گرم وزن تازه)	غلظت اکسین در ریشه (میکرومول بر گرم وزن تازه)	اسید در ریشه (میکرومول بر گرم وزن تازه)	نسبت اکسین به آبسزیک اسید در ریشه	وزن خشک ریشه (گرم در هر سانتی متر پوته)	طول ریشه
۱	۱۵/۲۶c	۴۸۸/۴a	۴۷/۰۸a	۱۶۳/۸ab	۸/۵bc	۱۹/۲۷ab	۰/۶۳a	۲۲/۱۵a
۲	۱۴/۹۹c	۴۱۳/۱abc	۴۲/۱۳ab	۱۶۵/۸a	۱۰/۵bc	۱۵/۷۹bc	۰/۶۵a	۲۲/۸۵a
۳	۲۴/۰۴a	۴۳۸/۲ab	۴۱/۰۴ab	۱۶۱/۸abc	۶/۵c	۲۴/۸۹a	۰/۴۵ab	۱۵/۸۲b
۴	۱۹/۶۵b	۳۷۲/۷bc	۴۰/۷۹ab	۱۵۱/۶bc	۱۴/۶۶ab	۱۰/۳۴cd	۰/۲۸b	۹/۸۴c
۵	۱۳/۹۶d	۳۳۳/۳cd	۳۷/۶ab	۱۴۸/۶c	۱۲/۷۶abc	۱۱/۶۵cd	۰/۴۵ab	۱۵/۸۲b
۶	۷/۹۸f	۲۸۹/۳d	۲۵/۱۹b	۱۵۵/۱abc	۱۴/۲۳ab	۱۰/۹۰cd	۰/۲۳b	۸/۰۸c
۷	۸/۹۸e	۳۴۷/۶cd	۴۵/۵۴a	۱۶۱/۶abc	۱۷/۲۴a	۹/۳۸cd	۰/۴۰ab	۱۴/۰۶b
۸	۸/۲۴f	۳۴۶/۷cd	۵۰/۵۳a	۱۶۳/۶ab	۱۹/۲۴a	۸/۵۱d	۰/۲۳b	۸/۰۸c

عنصر روی جهت سنتز اکسین (تنظیم‌کننده رشد) ایندول استیک اسید (IAA) مورد نیاز است. توقف رشد و کوچکی برگ مشخص‌ترین علائم قابل مشاهده کمبود عنصر روی است که نتیجه اخلال در سازوکار اکسین است، به ویژه سطوح پایین IAA ممکن است ناشی از ساخته نشدن IAA یا افزایش تخریب IAA باشد. شواهد فراوانی وجود دارد که عنصر روی برای سنتز تریپتوفان (پیش‌ماده بیوسنتز IAA) مورد نیاز است. از جمله این مشاهدات، افزایش میزان تریپتوفان در دانه‌های برنج پس از مصرف عنصر روی در گیاهان رشد نموده در خاک آهکی است (Brown *et al.*, 1993؛ Taiz and Zeiger, 2002؛ Heldt, 2005).

در رابطه با غلظت اکسین در ریشه جدول ۴ نشان می‌دهد که محلول‌پاشی اکسین به تنهایی (تیمار ۵) تأثیر معنی‌داری بر افزایش غلظت اکسین در ریشه نسبت به غلظت اکسین در ریشه در گیاهان شاهد (به ترتیب تیمارهای ۶ و ۷) نداشت و حتی نسبت به تیمار ۸ (بدون محلول‌پاشی) نیز کاهش معنی‌داری داشت. محلول‌پاشی

کلات روی بدون اکسین یا همراه با اکسین (به ترتیب تیمارهای ۳ و ۴) نسبت به محلول‌پاشی اکسین به تنهایی (تیمار ۵) تأثیر معنی‌داری بر غلظت اکسین در ریشه نداشتند. محلول‌پاشی سولفات روی به تنهایی یا همراه با اکسین (به ترتیب تیمارهای ۲ و ۱) نسبت به تیمارهای شاهد (تیمارهای ۶، ۷ و ۸) تأثیر معنی‌داری بر غلظت اکسین در ریشه گیاهان نداشت، اما نسبت به گیاهان محلول‌پاشی شده با اکسین به تنهایی (تیمار ۵) به طور معنی‌داری سبب افزایش غلظت اکسین در ریشه شد. این امر نشان دهنده تأثیر محلول‌پاشی ترکیبات عنصر روی بر انتقال هورمون اکسین است. در خصوص تأثیر نوع ترکیبات عنصر روی بر انتقال اکسین در پیکره گیاه سازوکار مشخصی ارایه نشده است، اما به نظر می‌رسد از جمله عوامل مؤثر بر انتقال اکسین، غلظت آن در گیاه است که خود غلظت تابعی از غلظت عنصر روی در گیاه است که ساخت اکسین را تنظیم می‌کند. بخشی از غلظت‌های اکسین در برگ‌ها به علت فرآیندهای سازوکاری تنظیم‌کننده اکسین در گیاه است

است. اصولاً انتقال اکسین قطبی است و جهت آن عمدتاً از بالا به پایین است و میزان غلظت آن به طور ویژه بستگی به وضعیت رشد اندام گیاهی نیز دارد (Taiz and Zeiger, 2002). میانگین غلظت این هورمون در برگ و ریشه در تحقیق حاضر نیز مؤید این مطلب است. بررسی روابط بین انتقال اکسین و تولید انشعابات بخش هوایی در گیاه ذرت نشان داد که تولید این انشعابات در ذرت طی نمو رویشی و زایشی انجام شد که بیانگر اثر تنظیمی و فعالیت ناقلان در سازوکار حرکت قطبی اکسین است و می‌تواند توجیه کننده نقش اکسین در افزایش وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ها در این مطالعه باشد (Gallavotti *et al.*, 2008). نکته مهم در این میان مشاهده تغییرات تقریباً موازی غلظت دو هورمون اکسین و آبسزیک اسید در برگ است، در حالی که این روند در ریشه مشاهده نمی‌شود. در این خصوص LaMotte و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی روابط کمی بین دو هورمون IAA و ABA در برگ‌های در حال رشد گیاه زینتی حسن یوسف (*Coleus blumei*) کاهش موازی غلظت این دو هورمون را گزارش نموده‌اند که این نتیجه با یافته‌های مطالعه حاضر تا حدود بسیاری مطابقت دارد.

با توجه به افزایش غلظت اکسین در ریشه، نسبت دو هورمون اکسین و آبسزیک اسید در ریشه بیش از بخش هوایی شد که این افزایش نسبت به نفع اکسین در ریشه می‌تواند عامل اصلی افزایش وزن خشک و طول ریشه در همین تیمارها باشد که در جدول ۴ قابل مشاهده است. در تأیید این نکته Schiefelbein (۲۰۰۳) اعمال تیمار هورمون اکسین را در تشکیل ریشه‌های جانبی و نابجا مؤثر می‌داند و همچنین در مطالعات ژنتیک مولکولی Fukaki و همکاران (۲۰۰۷) روی

که عامل مهمی برای تنظیم اکسین آزاد بوده است. در خصوص انتقال IAA از بخش هوایی (ناشی از محلول یا بیوسنتز طبیعی IAA) دو سیستم اصلی شناخته شده است: الف) سیستم انتقال یک طرفه، قطبی و انرژی‌خواه و ب) سیستم انتقال غیرقطبی و غیرفعال از طریق آوند آبکش (Taiz and Zeiger, 2002). به نظر می‌رسد با توجه به روند تقریباً مشابهی که در غلظت‌های IAA برگ و ریشه مشاهده می‌شود می‌بایست سازوکاری سریع در انتقال این هورمون در گیاه نقش داشته باشد. بر اساس جدول ۴ محلول پاشی ترکیبات مختلف سولفات یا کلرات روی یا اکسین تأثیری بر غلظت آبسزیک اسید در برگ و در ریشه گیاهان نسبت به گیاهان شاهد (تیمارهای ۶، ۷ و ۸) نداشت.

همان‌طور که اشاره شد تیمارهایی که بیشترین سطح غلظت IAA را در برگ‌ها ایجاد کرده‌اند بیشترین سطح غلظت این هورمون را در ریشه‌های جانبی نیز نشان دادند. زیرا با توجه به نمونه‌برداری انجام شده حدود سه ساعت پس از محلول پاشی، سیستم انتقال غیرفعال از طریق آوند آبکش محتمل‌ترین راه است. بنابراین به نظر می‌رسد نتایج بررسی حاضر وجود سیستم انتقال غیرقطبی و غیرفعال اکسین از طریق آوند آبکش را که Taiz و Zeiger (۲۰۰۲) به آن اشاره کرده بودند را تأیید می‌کند. احتمالاً اکسین ساخته شده در برگ‌های بالغ یا جذب شده از طریق محلول پاشی، به صورت غیرقطبی که نسبت به انتقال قطبی انتقالی سریع‌تر محسوب می‌گردد از طریق آوندهای آبکش به سایر قسمت‌های گیاه منتقل شده است. در خصوص گیاهچه‌های ذرت، حرکت غیرقطبی از طریق آوند آبکش، مسؤل صدور و توزیع IAA ترکیبی از گیاهک جوانه زده به نوک کولتوپتیل شناخته شده

که غلظت‌های بالاتر از حدود بحرانی اکسین (تقریباً^{۸-} ۱۰ مولار) مانع از طویل شدن ریشه‌های اولیه می‌شود. اما تشکیل ریشه‌های فرعی و نابجا توسط مقادیر زیاد تنظیم‌کننده رشد اکسین تحریک می‌گردد (Taiz and Zeiger, 2002). این ریشه‌های فرعی و نابجا معمولاً در ناحیه‌ای بالاتر از ناحیه طویل شدن تارهای کشنده یافت می‌شوند و از گروه‌های کوچکی از سلول‌های دایره محیطه یا ریشه‌زا منشأ می‌گیرند که این سلول‌ها توسط اکسین به تقسیم سلولی تحریک می‌شوند. سلول‌های در حال تقسیم شدن به تدریج ریشه را تشکیل می‌دهند و ریشه‌های جانبی از میان لایه کورتکس و اپیدرم ریشه رشد می‌کند (Taiz and Zeiger, 2002).

به نظر می‌رسد یکی از آثار محلول پاشی تیمارهای حاوی اکسین، افزایش وزن خشک ریشه ناشی از افزایش طول ریشه و در نتیجه افزایش ذخیره ماده خشک است. همبستگی زیاد بین این دو صفت در جدول ۵ دلیلی بر این موضوع است. در واقع، از طریق طول ریشه‌ها، حجم ریشه در واحد حجمی خاک افزایش می‌یابد.

در بررسی اثر عنصر روی و اکسین بر تشکیل ریشه‌های نابجا و رشد آن در گیاه برنج گزارش شده است که مصرف عنصر روی به تنهایی تأثیری بر تعداد ریشه در گیاه ندارد و علت آن این است که مراحل ریشه‌دهی شامل دو مرحله اصلی است: الف) مرحله تشکیل آغازی‌های ریشه و ب) مرحله طویل شدن. از این رو، تشکیل آغازی‌های ریشه نتیجه عمل اکسین و طویل شدن ریشه نتیجه عمل عنصر روی است (Inoue et al., 2006). در مقابل، نتایج پژوهش حاضر وجود اثر متقابل میان عنصر روی و محلول پاشی اکسین را نشان نداد و اثر هر یک از آنها به طور جداگانه قابل

جهش‌یافته‌های گیاه آراییدوسیس (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh) چنین نتیجه گرفته شد که برای القای تشکیل ریشه‌های جانبی بین جریان درون و برون سلولی اکسین، بایستی تعادل برقرار باشد. از این رو، نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مشابه پژوهش‌های اشاره شده نقش اساسی اکسین در القای ریشه زایی را مورد تأکید قرار می‌دهد.

داده‌های جدول مقایسه میانگین اثر محلول پاشی عنصر روی بر صفات مختلف ریشه (جدول ۴) نیز گویای آثار بارز دو ترکیب حاوی عنصر روی یعنی سولفات و کلرات روی بود، به ویژه آن که تأثیرات سولفات و کلرات روی بر وزن خشک ریشه مشابه بود و در یک گروه قرار گرفتند، اما در مورد صفت طول ریشه ترکیب سولفات روی نسبت به کلرات روی و سایر تیمارها یعنی محلول پاشی با آب و بدون محلول پاشی دارای برتری بود.

گزارش‌های ارایه شده در رابطه با اثر تحریک‌آمیز رشد ریشه ناشی از اکسین متناقض هستند. آنچه که از جمع‌بندی این پژوهش‌ها قابل برداشت است توجه به سطوح غلظت تنظیم‌کننده رشد اکسین در ریشه است. بدین نحو که تحریک رشد ریشه توسط اکسین دارای یک حد بحرانی غلظت است. به طوری که غلظت‌های اندک اکسین به مقادیری در حدود 10^{-10} تا 10^{-9} مولار، رشد ریشه‌های سالم را افزایش، اما غلظت‌های بیش از 10^{-6} مولار از رشد ریشه جلوگیری می‌کند (Taiz and Zeiger, 2002). به هر حال، اکسین ریشه اغلب در اندام‌های هوایی ساخته و به ریشه منتقل می‌گردد، بنابراین این احتمال وجود دارد که با انجام محلول پاشی اکسین و جذب توسط بخش هوایی بخشی از آن به ریشه‌های گیاه منتقل شده است. با وجود آن

مشاهده بود.

Yokoyama (۲۰۰۶) در مطالعه تأثیر فیزیولوژیک عنصر روی بر رشد اندام‌های جدید در گیاهان عالی به نقش این هورمون در ریشه‌زایی اشاره می‌کند و از سوی دیگر اضافه می‌نماید که اثر افزایشی عنصر روی بر عمل اکسین در ریشه‌زایی گیاه تاکنون ناشناخته باقی مانده است. وی چنین نتیجه‌گیری نمود که عنصر روی بدون کاربرد اکسین هیچ تأثیر معنی‌داری بر وزن بخش هوایی و ریشه نداشته است که مطالعه حاضر در بخش ریشه نشان داد که عنصر روی حتی در غیاب اکسین نیز اثر افزایشی در وزن خشک و طول ریشه داشت اما همچنین وزن تر و خشک بخش هوایی تحت تأثیر هیچ یک از دو تیمار محلول پاشی عنصر روی و اکسین قرار نگرفته است.

Yokoyama و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر عنصر روی بر تشکیل کالوس و ریشه‌های به وجود آمده از القای اکسین در بذور برنج به نقش فیزیولوژیک اکسین در تشکیل کالوس و ریشه به ویژه در شرایطی که غلظت بالای از عنصر روی و اکسین در محیط کشت باشد تأکید کرده‌اند. آنها همچنین به ارتباط مستقیم عنصر روی با نقش فیزیولوژیک اکسین نیز اشاره کرده‌اند. در این رابطه، به نقش اکسین در تشکیل آغازی‌های ریشه و نقش عنصر روی در تولید شدن ریشه اشاره شده است که می‌تواند عامل اصلی انگیزش افزایش وزن خشک و طول ریشه در تحقیق حاضر باشد (Inoue et al., 2006).

با بررسی اثر محلول پاشی سولفات روی به همراه اکسین و ماده توین ۲۰ در ریشه چنین مشاهده شد که میزان غلظت ABA کاهش و غلظت IAA افزایش یافته است. پس تعادل بین ABA و IAA در ریشه موجب

تحریک رشد طولی ریشه و افزایش وزن خشک ریشه شده است اما در بخش هوایی (برگ‌ها) تعادل هورمونی طوری بوده است که در وزن خشک بخش هوایی نسبت به شاهد افزایشی مشاهده نشد. در خصوص افزایش عملکرد ماده خشک با مصرف سه نوع کود ریزمغذی، علت‌های مختلفی ذکر شده که از آن جمله می‌توان به افزایش بیوسنتز اکسین در حضور عنصر روی اشاره کرد (Sharafi et al., 2002).

در مطالعه نقش صفات مرفولوژیک ریشه در رشد گیاه جو در خاک‌های مبتلا به کمبود عنصر روی چنین نتیجه‌گیری شد که نمو و توسعه ریشه‌های موین تحت تأثیر وضعیت عنصر روی قرار نگرفته است (Genc et al., 2000). بر اساس گزارش موجود، بدیهی است جذب بهتر عنصر روی از محلول خاک همبستگی بالایی با سطح تماس بیشتر ریشه دارد و در این میان نقش ریشه‌های موین حایز اهمیت است (Genc et al., 2000).

بر اساس جدول ۵ چنین مشاهده می‌شود که بین غلظت اکسین و آبسزیک اسید رابطه مثبت و معنی‌داری با ضریب نسبتاً بالا مشاهده می‌گردد که نشان‌دهنده تغییرات موازی غلظت این دو هورمون در بخش هوایی گیاه (برگ‌ها) است.

چنین وضعیتی در گیاه حسن یوسف گزارش شده است (LaMotte et al., 2002). در نتایج مشابه، Peres و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تجمع آبسزیک اسید و اکسین در ریشه در حال رشد گیاه *Catsetum fimbriatum* در محیط کشت محتوی سوکروز و مانیتول، افزایش موازی در میزان آبسزیک اسید و اکسین در جهت افزایش قند را گزارش نموده‌اند و همبستگی میان تولید شدن ریشه و نسبت ABA/IAA

را مشاهده نمودند. به علاوه، بررسی ریشه‌ها افزایش غلظت اکسین و ترکیبات مشابه آن را نشان می‌دهد. این نتایج با مشاهدات پژوهش حاضر به میزان زیادی همپوشانی دارد. تغییرات موازی این دو هورمون با ضریبی پایین‌تر در ریشه نیز وجود دارد، اگرچه این ضریب معنی‌دار نبود. اما به لحاظ وجود همبستگی مثبت بین تغییرات غلظت این دو هورمون، غیرمعمول و در عین حال دارای اهمیت است. با وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار میان غلظت اکسین در برگ و ریشه می‌توان به این نتیجه رسید که سازوکار انتقال اکسین از بخش هوایی به ریشه‌ها از طریق آوند آبکش در اندک زمانی پس از محلول‌پاشی موجب افزایش موازی این

هورمون در بخش‌های هوایی و ریشه‌ها شده است و در پی افزایش غلظت اکسین شاهد افزایش رشد طولی، وزن تر و خشک ریشه شده است که روابط همبستگی مثبت و معنی‌دار غلظت اکسین برگ با صفات اشاره شده در جدول ۵ این مطلب را تأیید می‌کند (Taiz and Zeiger, 2002). در این رابطه، Zengin (۲۰۰۶) در مطالعه اثر دو عنصر کبالت و روی بر میزان پروتئین، آبسزیک اسید، پرولین و کلروفیل در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) افزایش آبسزیک اسید در گیاهانی که با عنصر روی تیمار شده بودند را گزارش نمود و اضافه کرد که این افزایش در برگ‌ها بیش از ریشه‌ها بود.

جدول ۵- ضرایب همبستگی صفات. * و ** معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

اکسین	آبسزیک اسید برگ	اکسین ریشه	آبسزیک اسید ریشه	نسبت اکسین به آبسزیک اسید برگ	نسبت اکسین به آبسزیک اسید ریشه	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	طول ریشه
۱										
۰/۸۴۴**	۱									
۰/۸۹۳**	۰/۷۵۸**	۱								
۰/۱۴۵	۰/۱۹۶	۰/۳۷۸	۱							
-۰/۰۲۶	-۰/۵۲۰**	-۰/۰۱۶	-۰/۰۷۴	۱						
۰/۵۶۴**	۰/۴۳۹*	۰/۴۴۸*	۰/۶۱۱**	-۰/۰۱۲	۱					
۰/۰۵۵	۰/۳۳۰	-۰/۰۱۳	-۰/۰۹۲	-۰/۴۸۹*	۰/۱۱۵	۱				
۰/۴۹۶*	۰/۵۷۹**	۰/۳۳۷	-۰/۲۲۵	-۰/۳۴۳	۰/۵۰۴*	۰/۱۶۰	۱			
-۰/۳۲۱	-۰/۱۴۵	-۰/۳۰۲	-۰/۰۱۴	-۰/۲۰۱	-۰/۱۹۹	۰/۷۲۹**	-۰/۵۱۴*	۱		
۰/۴۸۷*	۰/۵۷۵**	۰/۳۳۰	-۰/۲۲۷	-۰/۳۵۲	۰/۵۰۴*	۰/۱۷۴	۰/۹۹۹**	-۰/۵۰۳*	۱	

که تعیین کننده نمو گیاه است، بسیار پیچیده می باشد (Vanstraelen, and Benkova, 2012).

نتیجه گیری

محلول پاشی عنصر روی و تنظیم کننده رشد اکسین بر غلظت اکسین و آبسزیک اسید در برگ و ریشه اثر داشت اما نسبت اکسین به آبسزیک اسید را تنها در ریشه تحت تأثیر قرار داد، همچنین بر صفات وزن خشک ریشه و طول آن اثر داشت. از سوی دیگر، تغییرات دو هورمون به صورت همسو بود که برخی نتایج پیشین وجود چنین تغییراتی را تأیید کرده بودند، اما استدلال سازوکار حرکت یک طرفه تاکنون ناشناخته باقی مانده است و به بررسی های بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری ها و زحمات کارکنان مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران در خصوص اجرای مطالعات گلخانه ای و همکاران بخش فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به خاطر مساعدت ها و همکاری های لازم در اجرای مراحل سنجش های هورمونی بافت های گیاهی صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

میزان غلظت آبسزیک اسید در برگ نیز با غلظت اکسین در ریشه اثر مثبت، معنی دار و با ضریب بالایی را نشان می دهد که تأیید دیگری است بر وجود روابط مثبت و موازی غلظت اکسین و آبسزیک اسید هم در بخش هوایی (برگ ها) و هم در بخش ریشه. برخلاف انتظار، همبستگی افزایش غلظت آبسزیک اسید در برگ با وزن خشک و همچنین طول ریشه مثبت بود که با توجه به تغییرات موازی آبسزیک اسید و اکسین در بخش هوایی و ریشه قابل انتظار بود. افزایش موازی دو هورمون اکسین و آبسزیک اسید در بخش های هوایی و ریشه، آنها را به یک مخزن قوی مبدل ساخته است که نتیجه آن افزایش انباشتگی مواد فتوسنتزی در این اندام ها است (Peres et al., 2009; LaMotte et al., 2002).

در نتیجه ای مشابه Cakmak و همکاران (۱۹۸۹) در بررسی اثر وضعیت تغذیه ای عنصر روی بر رشد، سوخت و ساز پروتئین و سطح IAA و سایر هورمون های گیاهی بر لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به تغییرات همسو و کاهش هورمون های IAA و ABA در بخش هوایی اشاره شد. البته، قضاوت درباره سازوکار اثر متقابل هورمون ها بسیار دشوار است و بر اساس مشاهدات Nahodil (۲۰۱۰) در رابطه با برهمکنش آنها گزارش های متناقضی ارائه شده است. از سوی دیگر، روابط و برهمکنش هورمون های گیاهی

منابع

- Alizadeh, A. (2004) Water, soil and plant relationships. Emam Reza University Press, Mashhad (in Persian).
- Alloway, B. J. (2004) Zinc in soils and crop nutrition. 1st edition, International Zinc Association, (IZA), Brussels.
- Brown, P. H., Cakmak, I. and Zhang, Q. (1993) Form and function of zinc in plants. In: Zinc in soils and plants. (Ed. Robson, A. D.) 90-106. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Cakmak, I., Marschner, H. and Bangerth, F. (1989) Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany* 40(3): 405-412.
- Fukaki, H., Okushima, Y. and Tasaka, M. (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology* 256: 111-137.
- Gallavotti, A., Yang, Y., Schmidt, R.J. and Jackson, D. (2008) The relationship between auxin transport and maize branching. *Plant Physiology* 147: 1913-1923.
- Genc, Y., McDonald, G. K. and Graham, R. D. (2000) Effect of seed zinc content on early growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under low and adequate soil zinc supply. *Australian Journal of Agricultural Research* 51: 37-45.
- Hanway, J. J. (1971) How a corn plant develops. Iowa State University Cooperative Extension Service Special Report 48, Iowa City.
- Heldt, H. W. (2005) *Plant biochemistry*. 3rd edition, Elsevier Academic Press, San Diego.
- Inoue, A., Udonishi, K., Saeki, Y., Nagatomo, Y. and Akao, S. (2006) Effect of zinc and auxin on the formation of adventitious roots and its growth in rice plants. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, University of Miyazaki* 52(1.2): (57-64).
- LaMotte, C., Li, X., Jacobs, W. and Epstein, E. (2002) Quantitative relationship between indole-3-acetic acid and abscisic acid during leaf growth in *Coleus blumei*. *Journal of Plant Growth Regulation* 36: 19-25.
- Malakouti, M. J. and Tehrani, M. M. (2001) Effects of micronutrients on the yield and quality of agricultural products. *micro-nutrients with macro-nutrients*. 2nd edition. Tarbiat Modarres University Press, Tehran (in Persian).
- Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd edition. Academic Press, London.
- Nahodil, D. (2010). *Hormone interactions and regulation of seedling growth*. PhD thesis, University of Tasmania, Australia.
- Peres, L. E. P., Zsogon, A. and Kerbauy, G. B. (2009) Abscisic acid and auxin accumulation in *Catsetum fimbriatum* roots growing *in vitro* with high sucrose and mannitol content. *Biologia Plantarum* 53(3): 560-564.
- Ruzicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorska, R., Beeckman, T., Friml, J. and Benkova, E. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell* 19: 2197-2212.
- Salama, Z. A., EloFouly, M. M., Lazova, G. and Popova, L. P. (2006) Carboxylating enzymes and carbonic anhydrase functions were suppressed by zinc deficiency in maize and chickpea plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 28(5): 445-451.
- Salardini, A. A. and Mojtahedi, M. (1994) *Principles of plant nutrition, fundamental aspects*, Tehran University Press, Tehran.
- Schiefelbein, J. (2003) Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 74-78.
- Sharafi, S., Tajbakhsh, M., Majidi, M. and Pourmirza, A. (2002) Effect of iron and zinc fertilizer on yield and yield components of two forage corn cultivars in Urmia. *Soil and Water* 12: 85-94 (in Persian).
- Sudhalakshmi, C., Krishnasamy, R. and Rajarajan, A. (2007) Influence of zinc deficiency on shoot/root

- dry weight ratio of rice genotypes. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3(4): 295-298.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002) *Plant physiology*. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland.
- Vanstraelen, M. and Benkova, E. (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 463-487.
- Yokota, T., Nahayama, M., Harasawa, I. and Kawabe, S. (1994) Polyamines, indole-3 acetic acid and abscisic acid in rice phloem sap. *Journal of Plant Growth Regulation* 15: 125-128.
- Yokoyama, M. (2006) Physiological studies of zinc on the growth of new organs in higher plants. *Bulltin of Miyazaki Agricultural Research Institute* 41: 1-39.
- Yokoyama, M., Shibahara, R. and Takagi, H. (2008) Effect of zinc on auxin- induced callus formation and auxin-induced root formation in rice [*Oryza sativa*] seeds. *Bulltin of Miyazaki Agricultural Research Institute* 43: 1-7.
- Zand, B., Sorooshzadeh, A., Ghanati, F. and Moradi, F. (2010) Effect of zinc and auxin foliar application on some anti-oxidant enzymes activity in corn leaf. *Iranian Journal of Plant Biology* 2(3): 35-48 (in Persian).
- Zare Dehabadi, S., Asrar Z. and Mehrabani, M. (2010) Biochemical changes in terpenoid compounds of *Mentha spicata* essential oils in response to excess zinc supply. *Iranian Journal of Plant Biology* 2(3): 25-34 (in Persian).
- Zengin, F. K. (2006) The effect of Co^{2+} and Zn^{2+} on the contents of protein, abscisic acid, proline and chlorophyll in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings. *Journal of Environmental Biology* 27(2): 441-448.

اثر رقم، سرما و پاکلوبوترازول بر رشد، محتوای کلروفیل و جراثت غشای سلول در گیاهچه لوبیا

ریحانه عموآقایی* و الهام شریعت

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

پاکلوبوترازول از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از گروه تریازول‌ها است که می‌تواند گیاهان را از انواع تنش‌ها محافظت کند. پژوهش حاضر، برای بررسی اثر غلظت پاکلوبوترازول (۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بر کاهش آسیب‌های ناشی از تنش سرما (دمای ۵ درجه سانتیگراد) روی گیاهچه‌های دو رقم لوبیا (لوبیا سفید رقم دانشکده و لوبیا قرمز رقم صیاد) اجرا شد. نتایج نشان داد که تنش سرما طول، وزن تر و خشک ریشه، بخش هوایی و میزان کلروفیل را کاهش و درصد نشت الکترولیتی از غشای سلول‌ها را افزایش داد. پاکلوبوترازول موجب کاهش طول، وزن تر و خشک بخش هوای گردید اما در شرایط تنش موجب افزایش وزن خشک ریشه‌ها شد. علاوه بر این، زمانی که گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول در معرض تنش سرما قرار گرفتند، میزان نشت الکترولیتی کمتری نسبت به شاهد نشان دادند. تیمار گیاهچه‌ها با پاکلوبوترازول میزان کلروفیل را در شرایط تنش و غیرتنش افزایش داد. رقم لوبیا سفید نسبت به سرما حساس‌تر از لوبیا قرمز بود و اثر پاکلوبوترازول نیز در افزایش مقاومت به سرما در لوبیا سفید قوی‌تر از لوبیا قرمز بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که پاکلوبوترازول توانایی پاسخ گیاه به تنش سرما را بهبود می‌بخشد و این اثر به ویژه در ارقام حساس‌تر به سرما بیشتر مشهود است.

واژه‌های کلیدی: پاکلوبوترازول، تنش سرما، رشد، محتوای کلروفیل، لوبیا، نشت الکترولیتی

مقدمه

میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه است. خاستگاه اصلی لوبیا مناطق گرمسیری و آمریکای جنوبی است. لوبیا گیاهی بسیار حساس به سرما و یخبندان است و در بهار تا زمانی که درجه حرارت محیط به قدر کافی بالا نرود نمی‌توان به کشت آن مبادرت ورزید (Kooceki and Banayan Avval, 1989). درجه حرارت مناسب

پس از غلات، حبوبات (باقلا بیان) دومین منبع مهم غذایی بشر است. در بین حبوبات، لوبیا از نظر سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی، مقام نخست را دارد (Hosseini, 2004). لوبیا منبع سرشار و ارزان از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد غذایی معدنی برای ۵۰۰

لوبیا نباید کمتر از ۱۰ درجه باشد. مهم ترین مناطق لوبیاکاری در ایران استان‌های چهارمحال و بختیاری، زنجان، فارس، لرستان و مرکزی هستند (Hosseini, 2004). در برخی از این مناطق مانند چهارمحال و بختیاری گاه سرمای دیررس در اواخر اردیبهشت ماه مشکل مهمی در استقرار گیاهچه‌های لوبیا محسوب می‌شود و به همین علت پژوهش حاضر به بررسی این مهم پرداخته است.

در گیاهان حساس به سرما مثل لوبیا، قرار گرفتن در معرض دمای پایین اما بالاتر از دمای انجماد یعنی بین صفر تا ۵ درجه سانتیگراد گیاه را دچار اختلالات فیزیولوژیک ویژه نظیر کاهش سیالیت غشا می‌کند (Beck *et al.*, 2004). از جمله نشانه‌های آسیب سرما، کاهش رشد و سرعت فتوسنتز، رنگ پریدگی، خشک شدن یا نکروزیس، افزایش حساسیت به بیماری‌ها، نشت یون‌ها از غشا سلولی، تغییر در تولید اتیلن و تنفس و افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژنی است (Kuan-Hung *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2004; Tadjvar *et al.*, 2011). درجه آسیب سرما مرحله نمو و شرایط رشد و مواد تغذیه‌ای در طول تنش سرما بر حسب گونه گیاهی متفاوت است. آسیب سرما، همچنین به شرایط محیطی نظیر: دما، نور و آب بستگی دارد. مشخص شده است که در گونه‌های حساس به سرما، تنش سرما به علت تخریب اکسیداتیو ناشی از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب بیشتر می‌شود (Sevillano *et al.*, 2006; Kuan-Hung *et al.*, 2006; Woronuk *et al.*, 2010; *al.*, 2009).

به طور کلی، سازوکارهای مقاوم شدن به سرما در گیاهان شامل: تغییر در لیپیدهای غشا به منظور افزایش

برای رشد و نمو لوبیا حدود ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد است. در درجه حرارت‌های بالاتر از ۴۵ درجه سانتیگراد گیاه به بذرنمی‌نشیند و حرارت‌های پایین‌تر از ۱۵ درجه سانتیگراد نیز برای رشد و نمو آن مناسب نیست (Hosseini, 2004). Machado Neto و همکاران (۲۰۰۶) نیز در بررسی اثر دما بر جوانه زنی ارقام لوبیا گزارش کردند که اغلب ارقام لوبیا، نسبت به سرما حساس هستند و در تمام ارقام مطالعه شده جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در دمای زیر ۲۷ درجه سانتیگراد به تأخیر می‌افتد. اگر درجه حرارت در موقع کاشت لوبیاهای پاکوتاه از ۱۲ درجه و در لوبیاهای پابلند از ۱۴ درجه سانتیگراد کمتر باشد، رشد مناسبی حاصل نمی‌شود. لوبیای سفید گیاهی حساس به سرما است و به فصل زراعی بدون یخبندان و هوای خشک نیاز دارد. لوبیا سفید در مقایسه با انواع دیگر لوبیا مقاومت کمتری نسبت به شرایط نامطلوب دارد (Kooceki and Banayan Avval, 1989). پژوهشگران متعدد در بررسی اثر دما بر جوانه زنی لوبیا گزارش کردند که با وجود حساسیت لوبیا نسبت به سرما، واکنش ارقام لوبیا نسبت به دمای زیر حد بهینه تا حد زیادی تحت تأثیر ژنوتیپ آنها است به طوری که برخی ژنوتیپ‌ها نسبت به سرما متحمل‌تر از سایرین هستند (White and Montes, 1993; Hucl, 1993; Rodiño *et al.*, 2007). سطح زیرکشت لوبیا در ایران معادل ۱۱۰۲۴۸ هکتار و تولید ۲۲۵۷۲۰ تن است. بر اساس تحقیقات انجام شده در ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین، زمان مناسب برای کاشت ۲۰ اردیبهشت تا ۱۵ خرداد ماه و بهترین زمان آن هفته نخست خرداد ماه است. در هر حال، درجه حرارت در زمان کاشت

هستند، تریازول‌ها بیان می‌شوند و بروز این توانایی را تسهیل می‌کنند (Kuan-Hung؛ Fletcher *et al.*, 2000)؛ (2006). *et al.* تریازول‌ها بر مسیر سنتز ایزوپرنوئیدها اثر می‌گذارند و موجب ممانعت سنتز جیبرلین، کاهش اتیلن و افزایش سیتوکینین و آبسزیک اسید می‌شوند. مشتقات تریازول با ممانعت بیوسنتز جیبرلین توسط ممانعت از مراحل اکسیداسیون کائورن به کائورنال، سوبستراهایی برای بیوسنتز کاروتنوئید و آبسزیک اسید فراهم می‌کنند. به کرات ثابت شده است که القای افزایش تولید آبسزیک اسید، گیاهان را از تنش‌های محیطی مختلف محافظت می‌کند (Wilhelm *et al.*, 1987؛ Werbrouck and Debergh, 1996؛ Fletcher *et al.*, 2000). خاصیت ممانعت‌کنندگی رشد توسط تریازول‌ها از طریق به هم ریختن تمامیت غشا و عملکرد آن در نتیجه ذخیره متیل استرول‌ها است. استرول‌ها در تشکیل غشا جدید و تقسیم و طویل شدن سلول نقش دارند. بنابراین، وقتی سنتز استرول در پاسخ به تیمار پاکلوبوترازول ممانعت می‌شود، رشد ممانعت می‌شود. تریازول‌ها بیوسنتز استرول را تغییر می‌دهند و باعث کاهش کلسترول غشا می‌شوند که این تغییر باعث القا استحکام و سازگاری به سرما می‌شود (Fletcher and Hoftstra, 1988؛ Khan *et al.*, 2009). با توجه به شناخت چنین آثاری از پاکلوبوترازول و آثار سرما روی گیاهان این پژوهش در جهت بررسی اثر پاکلوبوترازول روی تعدیل آثار تنش سرما در گیاه لوبیا طراحی و به اجرا در آمده است.

مواد و روش‌ها

کاشت و تهیه نمونه: بذره‌های دو رقم (لوبیا سفید

سیالیت غشا، افزایش پتانسیل غلبه بر تنش اکسیداتیو از طریق آنزیم‌های جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن، ذخیره آنتوسیانین و تغییر در مورفولوژی رشد است. سازوکارهای دیگر مقاوم شدن شامل ذخیره کربوهیدرات‌ها، پکتین و نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌های ضد یخ و دهیدرین در بافت‌های گیاهی و افزایش سنتز ترکیبات محافظت‌کننده در برابر انجماد با وزن مولکولی کم یا زیاد در سیتوپلاسم است (Welling and Beck *et al.*, 2004؛ Koh, 2002)؛ (2006). Palva؛ Sariri *et al.*, 2011؛ Zamani Bahramabadi *et al.*, 2013). برخی از پژوهشگران اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر تریازول‌ها را در مقاومت به سرما گزارش کرده‌اند (Mahmut Sinan *et al.*, 2009). تریازول‌ها ترکیباتی هستند که به عنوان قارچ‌کش، ممانعت‌کننده سنتز ارگوسترول در قارچ و بیوسنتز فیتواسترول در گیاهان (Fletcher and Khan *et al.*, 2009؛ Hoftstra, 1988) تنظیم‌کننده رشد گیاه (ممانعت‌کننده سنتز جیبرلین) شناخته شده‌اند (Wilhelm *et al.*, 1987). تریازول‌هایی مانند پاکلوبوترازول، مانع رشد گیاه و طویل شدن، موجب افزایش مقادیر کلروفیل، بزرگ شدن کلروپلاست‌ها، ضخیم شدن بافت برگ، افزایش نسبت ریشه به ساقه، تولید آلکالوئیدها و افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌شوند (Fletcher *et al.*, 2000). همچنین، تریازول‌ها تغییرات هورمونی و اثر بیوشیمیایی نظیر رفع سمیت گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش پرولین و تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیداتی سلول‌ها را القا می‌نمایند و باعث مقاومت به تنش‌ها می‌شوند. در گیاهانی که دارای توانایی ذاتی در پاسخ به تنش‌ها

روش Arnon (۱۹۴۹) انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت تازه پهنک برگ‌های جوان از قسمت میانی برگ دوم گیاه وزن شدند و با استون ۸۰ درصد در هاون چینی روی یخ دور از نور مستقیم ساییده شدند. مخلوط به دست آمده با کاغذ صافی درون بالن ژوژه صاف شد و حجم عصاره به دست آمده با استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس، جذب محلول‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰ و ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شدند. از استون ۸۰ درصد به عنوان محلول بلانک استفاده شد. میزان کلروفیل های a و b بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت گیاهی از رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه شد. $A = \text{جذب نوری}$ ، $V = \text{حجم نهایی عصاره}$ و $W = \text{وزن بافت (بر حسب گرم)}$.

رابطه ۱:

$$Chl.a = \frac{[(12/77 \times A663) - (2/69 \times A645)] \times V}{1000 \times W}$$

رابطه ۲:

$$Chl.b = \frac{[(22/9 \times A645) - (4/93 \times A663)] \times V}{1000 \times W}$$

سنجش میزان نشت الکترولیتی: سنجش میزان

نشت الکترولیتی غشا پلاسمایی با روش Dionsio-sese و Tobita (۱۹۹۸) انجام شد. از هر تکرار ۰/۱ گرم از بافت تبر برگ شسته و در لوله آزمایش درپوش‌دار محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه قرار داده شد. این لوله‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. پس از ۳ ساعت هدایت الکتریکی آنها با استفاده از EC متر اندازه‌گیری شد. سپس شیشه‌های محتوی نمونه‌های برگ‌گی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و پس از سرد شدن برای دومین مرتبه EC آنها اندازه‌گیری شد.

دانشکده و لوییا قرمز صیاد) از مرکز تحقیقات کشاورزی شهر کرد تهیه شد. بذر ارقام لوییا پس از ضدعفونی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در پتری‌دیش‌های محتوی غلظت‌های پاکلوبوترازول ۰ و ۲۵ و ۵۰ (میلی‌گرم در لیتر) خیسانده و مطابق طرح آماری به گلدان‌های حاوی خاک (نسبت ۳ به ۱ خاک: شن و کود) منتقل شدند. گلدان‌های حاوی بذر به اتاق کشت منتقل و در معرض شدت نور ۱۲۰۰-۱۴۰۰ لوکس در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از دو هفته رشد (گیاهک‌های ۱۴ روزه) در اتاقک رشد، بخشی از گلدان‌ها در دمای ۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در معرض سرما قرار گرفتند و پس از اعمال تیمار سرما به تدریج به دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد (دو روز در هر دما) منتقل شدند. بخشی دیگر که به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند در تمام این مدت در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داشتند (Berova et al., 2002).

اندازه‌گیری رشد: برای اندازه‌گیری طول، وزن تر و خشک بخش‌های هوایی و ریشه، گیاهچه‌های ۲۱ روزه از گلدان‌های خارج شدند. بخش‌های هوایی و ریشه، از منطقه طوقه جدا و پس از اندازه‌گیری طول و وزن تر در پاکت‌های کاغذی مجزا قرار گرفتند. سپس، در آون با دمای 70 ± 5 درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. در پایان، وزن خشک بخش‌های هوایی و ریشه گیاهچه‌های دو رقم لوییا اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کلروفیل: اندازه‌گیری کلروفیل با

داد. در مقابل، تنش سرما و فقدان آن بر وزن خشک لوبیا قرمز اثری نداشت (شکل ۱). به طور کلی، رشد ساقه رقم لوبیا سفید حساسیت بیشتری به تنش سرما و پاکلوبوترازول نشان داد.

نتایج نشان داد که تیمار سرما در هر دو رقم لوبیا طول ساقه و وزن تر بخش هوایی را کاهش داد (شکل ۱) که میزان این کاهش در رقم لوبیا سفید بیش از رقم لوبیا قرمز بود. سرما وزن خشک لوبیا سفید را کاهش داد اما بر وزن خشک لوبیا قرمز اثری نداشت (شکل ۱). با اعمال پاکلوبوترازول در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) با تنش سرما و بدون آن، طول ساقه و وزن تر بخش هوایی هر دو رقم کاهش یافت. پاکلوبوترازول وزن خشک لوبیا سفید را در شرایط بدون تنش تغییر نداد اما تحت تنش سرما آن را کاهش داد. در مقابل، بر وزن خشک لوبیا قرمز در هر دو حالت اثری نداشت (شکل ۱). به طور کلی، رشد ساقه رقم لوبیا سفید حساسیت بیشتری به تنش سرما و پاکلوبوترازول نشان داد.

سرما شاخص‌های طول و وزن تر و خشک ریشه در رقم لوبیا سفید را کاهش داد (شکل ۲) اما اثر معنی‌داری بر همین شاخص‌ها در لوبیا قرمز نداشت. پاکلوبوترازول در شرایط عادی اثر معنی‌داری بر شاخص‌های ریشه در هر دو رقم نداشت در حالی که با اعمال پاکلوبوترازول در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) تحت تنش سرما این شاخص‌ها در لوبیا سفید افزایش یافت و در لوبیا قرمز بدون تغییر باقی ماند. به طور کلی، رشد ریشه رقم لوبیا سفید حساسیت بیشتری به تنش سرما و پاکلوبوترازول نشان داد.

درصد هدایت الکتریکی بیانگر میزان نشت الکتریکی مواد از غشا است که مطابق رابطه ۳ قابل محاسبه است. EC_1 و EC_2 هدایت الکتریکی (میکرو زیمنس) محلول‌ها به ترتیب قبل و پس از جوشیدن است.

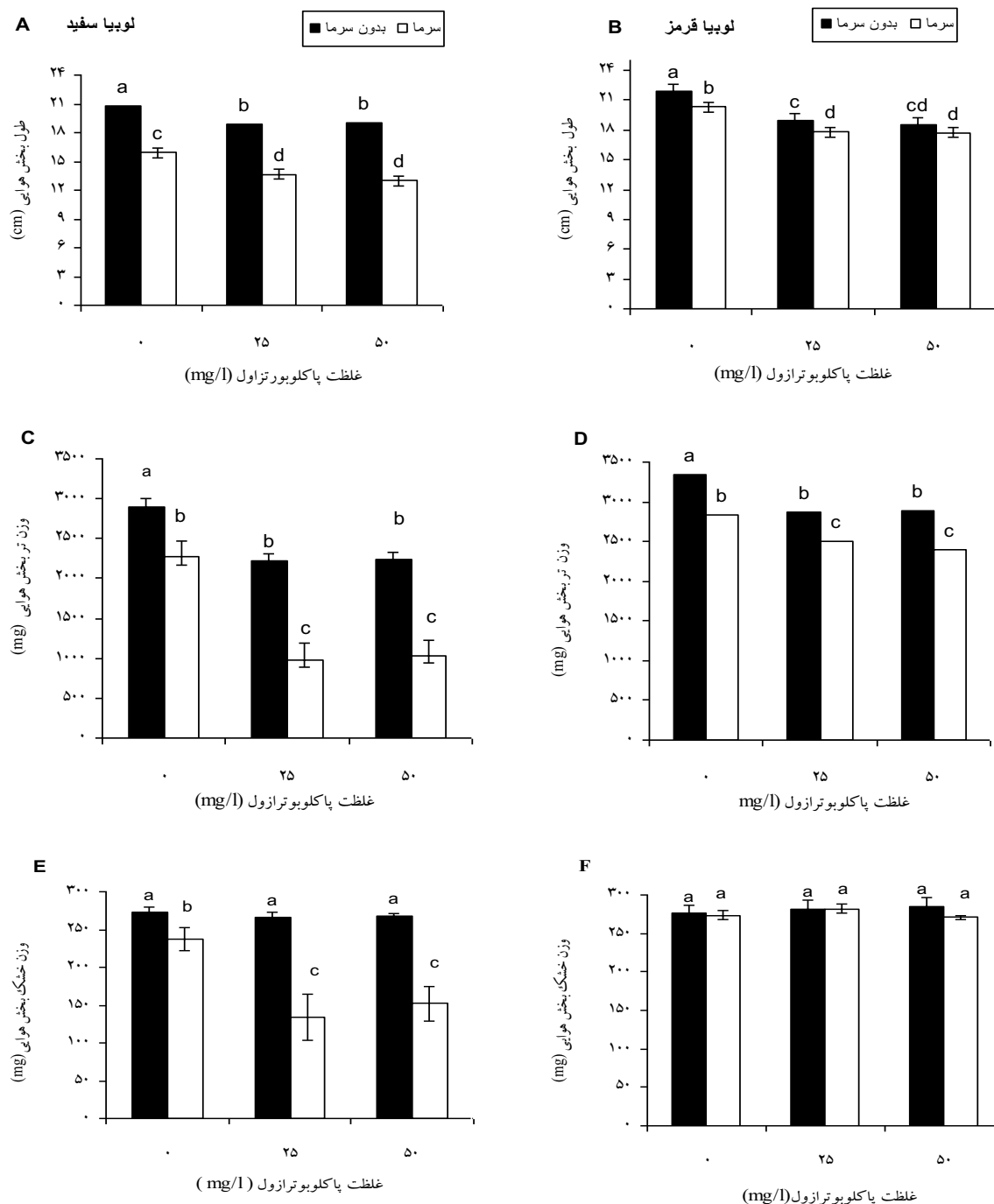
$$EC\% = (EC_1/EC_2) \times 100 \quad \text{رابطه ۳:}$$

تحلیل آماری: آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل بررسی شده شامل: رقم در دو سطح (لوبیا سفید دانشکده و لوبیا قرمز صیاد)، غلظت پاکلوبوترازول در سه سطح (۰ و ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر) و تنش سرما در دو سطح (شاهد و سرمادهی در ۵ درجه سانتیگراد) بود. غلظت‌های پاکلوبوترازول بر اساس گزارش‌های قبلی (Berova *et al.*, 2002) روی سایر گیاهان انتخاب شدند. آنالیز واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن و در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد.

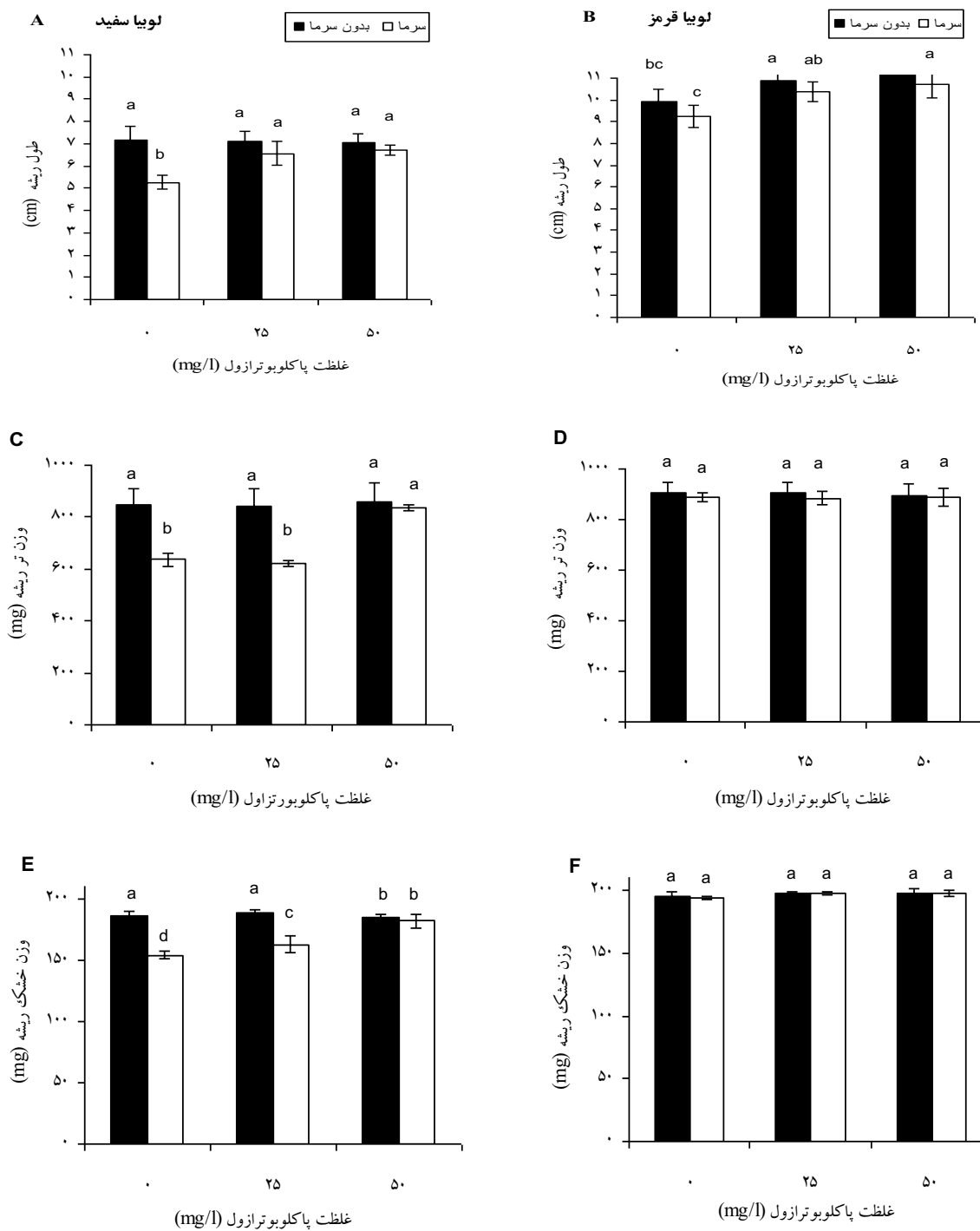
نتایج

نتایج نشان داد که تیمار سرما در هر دو رقم لوبیا سفید و قرمز، طول ساقه و وزن تر بخش هوایی را کاهش داد (شکل ۱) که میزان این کاهش در رقم لوبیا سفید بیش از رقم لوبیا قرمز بود. سرما وزن خشک لوبیا سفید را کاهش داد اما بر وزن خشک لوبیا قرمز اثری نداشت (شکل ۱).

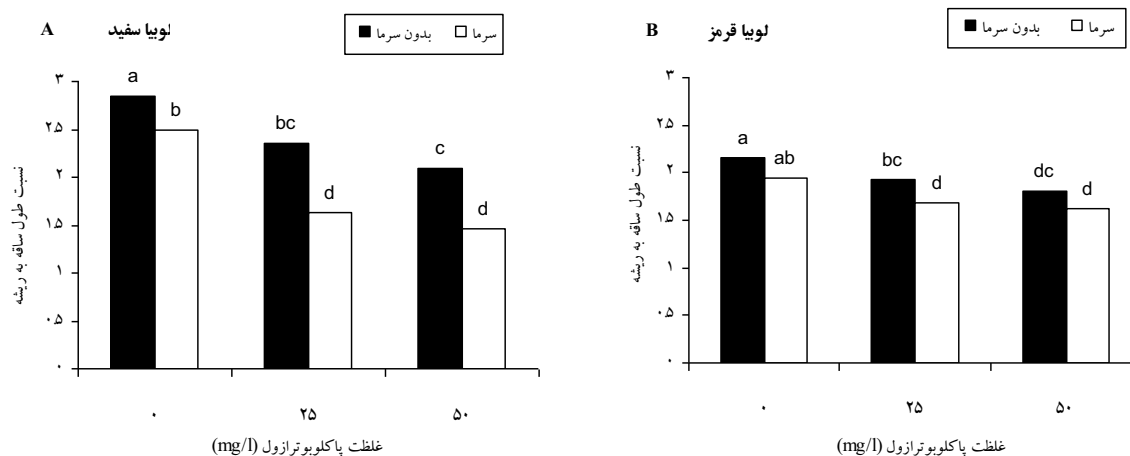
با اعمال پاکلوبوترازول در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) با تنش سرما و بدون آن طول ساقه و وزن تر بخش هوایی هر دو رقم کاهش یافت. پاکلوبوترازول وزن خشک لوبیا سفید را در شرایط بدون تنش تغییر نداد اما تحت تنش سرما آن را کاهش



شکل ۱- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر طول، وزن خشک و وزن تر بخش هوایی گیاهچه‌های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.



شکل ۲- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر طول، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه گیاهچه‌های لوییا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.



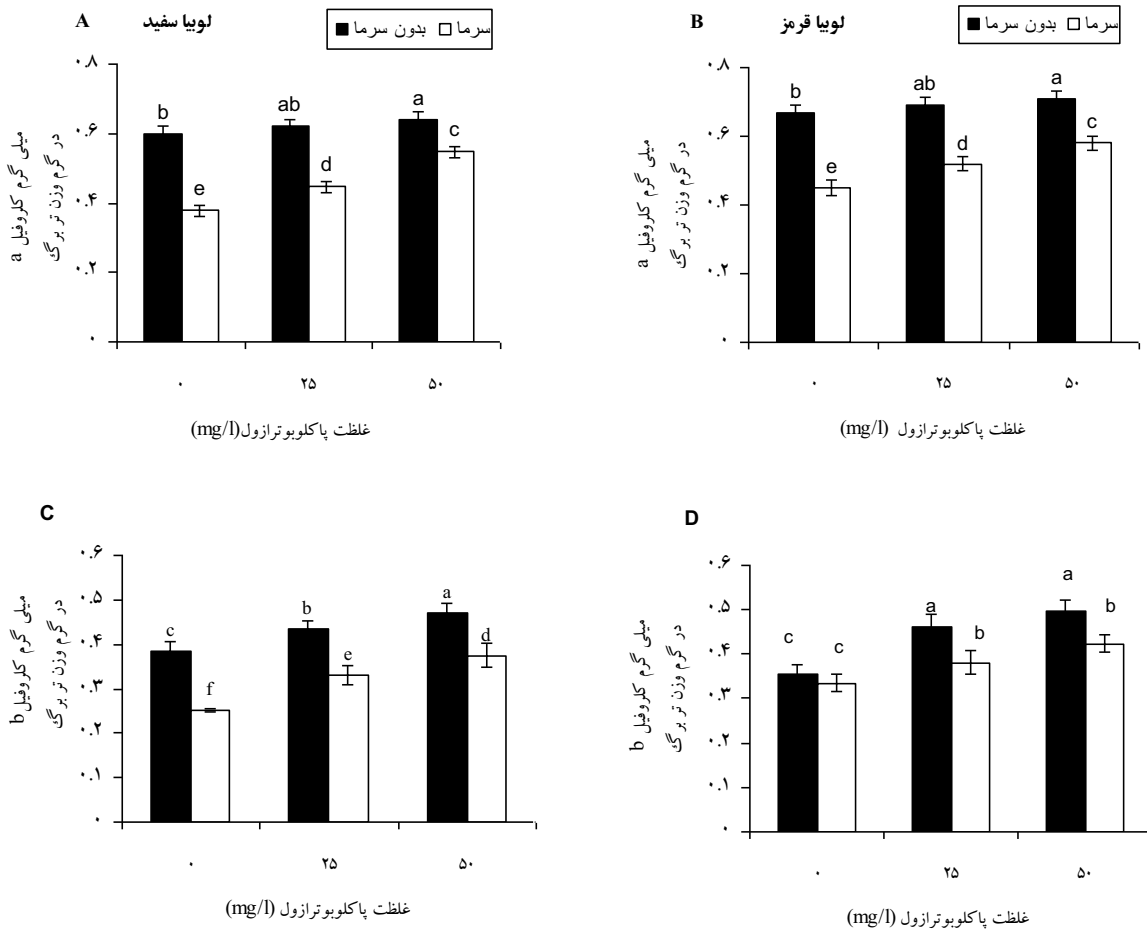
شکل ۳- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر نسبت طول ساقه به ریشه گیاهچه‌های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

شرایط شاهد بالا برد. اگرچه همواره مقادیر عددی کلروفیل‌های a و b در تمام تیمارها در رقم لوبیا قرمز بیشتر از لوبیا سفید بود اما درصد افزایش هر دو نوع کلروفیل در پاسخ به پاکلوبوترازول در رقم لوبیا سفید بیشتر از لوبیا قرمز بود (شکل ۴).

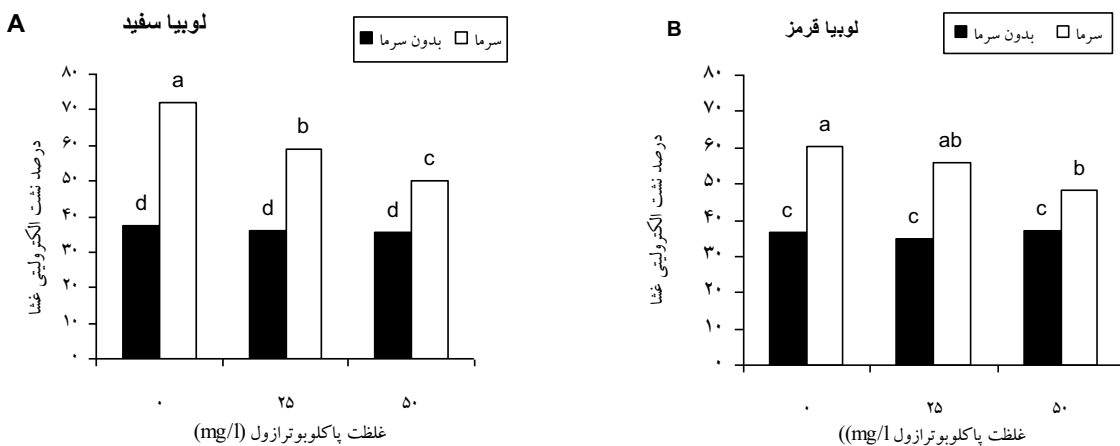
میزان نشت الکترولیتی از غشای سلول‌های هر دو رقم در شرایط عادی و بدون تنش سرما مشابه بود. اعمال تیمار سرما در رقم لوبیا سفید و قرمز به ترتیب حدود ۸۸ و ۶۱ درصد نشت الکترولیتی را افزایش داد. در شرایط بدون سرما پاکلوبوترازول اثر معنی‌داری روی میزان نشت الکترولیتی غشای هیچ یک از رقم‌های لوبیا نداشت اما در تنش سرما اعمال تیمارهای ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول نشت الکترولیتی را نسبت به شاهد سرما دیده کاهش داد. اما همچنان میانگین‌های این عامل بیشتر از تیمار بدون سرما بود (شکل ۵).

بررسی نسبت طول ساقه به ریشه نشان داد که سرما این نسبت را در لوبیا سفید کاهش داده اما در لوبیا قرمز تغییر نداده است. پاکلوبوترازول در هر دو رقم، نسبت طول ساقه به ریشه را کاهش داد (شکل ۳).

بررسی نتایج نشان داد که در هر دو رقم بالاترین مقدار کلروفیل‌های a و b در گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول ۵۰ (میلی گرم در لیتر) در شرایط بدون سرما به دست آمده است. در رقم لوبیا سفید، تیمار ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول و در رقم لوبیا قرمز، تیمار ۲۵ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول میزان کلروفیل a (شکل ۴) را نسبت به شاهد افزایش داد. سرما در هر دو رقم میزان کلروفیل a را در حد معنی‌داری کاهش داد. در رقم لوبیا سفید در حالت شاهد با اعمال سرما میزان کلروفیل b کاسته شد اما در رقم لوبیا قرمز تغییری نکرد. اعمال غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول میزان کلروفیل‌های a و b هر دو رقم را در هم در تنش سرما و هم در



شکل ۴- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر میزان کلروفیل های a و b در برگ های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $P < 0.05$ است.



شکل ۵- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر درصد نشت الکترولیتی در دو رقم لوبیا. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $P < 0.05$ است.

بحث

به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده، تنش سرما کلیه شاخص‌های رشد ریشه و ساقه را در هر دو رقم لوبیا در مقایسه با گیاهان تنش ندیده در حد قابل توجهی کاهش داده است (شکل‌های ۱ و ۲). این نتیجه یادآوری می‌کند که لوبیا یک گیاه حساس به سرما است و این مورد توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Mahmut Machado-Neto *et al.*, 2006؛ Woronuk *et al.*, 2010؛ Sinan *et al.*, 2009). کاهش رشد گیاه به ویژه رشد طولی بخش هوایی را می‌توان نتیجه اثر منفی تنش سرما، کاهش فتوسنتز و در نتیجه کمبود کربوهیدرات‌ها برای رشد گیاه دانست. از سوی دیگر، می‌توان آن را یک پاسخ سازشی برای گیاه تلقی کرد. به این معنا که در این شرایط، گیاهان به جای آن که کربوهیدرات‌ها را بیشتر صرف رشد طولی سلول نمایند، به طور محلول در سلول‌ها ننگه می‌دارند تا نقطه انجماد پروتوپلاسم را پایین آورند و از آسیب یخ‌زدگی زودرس حفاظت کنند (Beck *et al.*, 2004). همچنین هرچه تاج پوشش گیاه کوتاه و فشرده باشد هوا در درون آن محبوس شده و گرم‌تر می‌ماند و آرام‌تر با هوای سرد محیط مبادله می‌شود.

تیمار گیاهان با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول در مقایسه با شاهد، هم در حالت تنش و هم بدون تنش شاخص‌های رشد بخش هوایی را کاهش داد اما کاربرد این ماده مقدار وزن تر و خشک و طول ریشه را افزایش داد (شکل‌های ۱ و ۲). Jafari و همکاران (۲۰۰۶) نیز مشابه این نتایج را برای نهال‌های گوجه‌فرنگی گزارش کردند. Abdul Jaleel و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که شاخص‌های

رشد در گیاه *Chatharanthus roseus* تحت تنش سرما کاهش می‌یابد اما تیمار تریازول این اثر را بهبود می‌دهد. آنان همچنین گزارش کردند که ترکیبات تریازول موجب کاهش ارتفاع گیاه و افزایش وزن تر و خشک ریشه شده است و علت آن را اثر تریازول بر ممانعت از سنتز جیبرلین و افزایش سنتز سیتوکینین دانستند و معتقدند که افزایش رشد ریشه تحت تیمار این هورمون به علت افزایش سیتوکینین درونی گیاه است. Berova و همکاران (۲۰۰۲) نیز کاهش طول و وزن تر اندام هوایی و افزایش رشد ریشه در گیاهان گندم تیمار شده با پاکلوبوترازول را گزارش کردند که به افزایش نسبت ریشه به ساقه منجر شده است. نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد که تیمار پاکلوبوترازول در شرایط تنش و غیرتنش باعث کاهش نسبت ساقه به ریشه شده است (شکل ۳) و تغییر این نسبت بیشتر نتیجه کاهش طول ساقه در نتیجه تیمار با پاکلوبوترازول بوده است. کاهش شاخص طول اندام هوایی توسط تیمار پاکلوبوترازول احتمالاً به علت کاهش میزان سنتز جیبرلین است (Wilhelm *et al.*, 1987).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان مشاهده نمود که مقدار میانگین کلروفیل‌های a و b تحت تنش سرما در رقم لوبیا سفید و قرمز نسبت به شاهد کاهش یافته است. این نتایج با یافته‌های Berova و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد. کاهش کلروفیل تحت تنش سرما در سویا (Yadegari *et al.*, 2007)، گوجه‌فرنگی (Jafari *et al.*, 2006) و در نارنگی (Tadjvar *et al.*, 2011) نیز گزارش شده است. کلروز برگ‌ها نشانه اولیه سرما است که به علت کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی پدید می‌آید. کاهش رنگیزه‌ها می‌تواند به علت تأثیر

گزارش کرده‌اند (Sariri et al., 2007؛ Yadegari et al., 2011؛ Tadjvar et al., 2011). با اعمال تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول نشت الکترولیتی به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۵). این نتایج با نتایج Baninasab (۲۰۰۹) روی دانه‌رست‌های هندوانه مطابقت دارد. Jafari و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش کردند که افزایش با پاکلوبوترازول میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا نهال‌های گوجه فرنگی تحت تنش سرما را کاهش می‌دهد.

لیپیدها به عنوان اجزای اصلی غشاها از عوامل مهم حساسیت به دما در گیاهان هستند. به طوری که ارتباط مفیدی بین تحمل به دمای پایین با بیوسنتز و بازآرایی غشا در پاسخ به دما وجود دارد (Koh, 2002). تغییر در ترکیب و ساختار غشاهای زیستی، نخستین آسیب سرما محسوب می‌شود که روی نفوذپذیری غشا اثر می‌گذارد. این تغییرات شامل پراکسیداسیون لیپید، افزایش اسیدهای چرب اشباع، کاهش فسفولیپیدها و گالاکتولیپیدها و افزایش در نسبت استرول به فسفولیپید است. این تغییرات در ترکیب غشا با کاهش سیالیت غشا باعث کاهش عملکرد غشا و پروتئین‌های همراه آن می‌شود. از سوی دیگر، سرما موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژنی می‌شود که با حمله به غشا نشت یون‌ها و پراکسیداسیون لیپیدی غشا را افزایش می‌دهد (Sevillano et al., 2009). در مقابل، پاکلوبوترازول از این تغییرات جلوگیری می‌کند. ثابت شده است که تریازول‌ها بیوسنتز استرول را کاهش می‌دهند و باعث تغییر ترکیب کلسترول غشا می‌شوند که این تغییر باعث القا استحکام و سازگاری می‌شود (Fletcher and Hoftstra, 1988؛ Khan et al., 2009). همچنین

سرما در افزایش میزان پراکسیداسیون باشد. این تخریب می‌تواند در غشا کلروپلاست‌ها و تیلاکوئیدها رخ دهد و به کاهش میزان رنگیزه منتهی گردد (Tadjvar et al., 2011). نتایج نشان داد که اعمال غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول به طور معنی داری میزان کلروفیل‌های a و b را افزایش داده است (شکل ۴). Berova و همکاران (۲۰۰۲) و Jafari و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش کردند که پاکلوبوترازول اثر منفی تنش سرما روی رنگیزه‌ها را به طور معنی داری کاهش داده است. Baninasab (۲۰۰۹) نیز گزارش کرده است که غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول به طور معنی داری مقدار کلروفیل در گیاهچه‌های هندوانه تحت تنش سرما را در مقایسه با شاهد افزایش داد. برخی محققان معتقدند پاکلوبوترازول موجب گسترش ریشه و در نتیجه ساخت بیشتر سیتوکینین و افزایش انتقال آن به اندام هوایی می‌شود که این امر به افزایش سنتز کلروفیل منجر می‌گردد. همچنین ممکن است تریازول‌ها از طریق تأثیر بر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها به طور مستقیم بر بیوسنتز کلروفیل‌های و کاروتنوئیدها تأثیر بگذارند (Werbrouck and Debergh, 1996؛ Fletcher et al., 2000). یکی از نشانه‌های آسیب ناشی از تنش سرما، نشت الکترولیتی از برگ‌های تیمار شده است. در بررسی نتایج پژوهش حاضر مشاهده شد که در شرایط تنش سرما رقم لوبیا قرمز نسبت به لوبیا سفید نشت الکترولیتی کمتری را داشته است. اگرچه تحت تنش سرما در هر دو رقم در مقایسه با شاهد (بدون تنش سرما) افزایش نشت الکترولیتی مشاهده شد (شکل ۵). محققان دیگر نیز افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و نشت الکترولیتی از غشاهای گیاهان سویا، نارنج و نارنگی

این تغییرات نتیجه تغییرات هورمونی است که توسط پاکلوبوترازول القا شده است. گزارش شده است که تریازول مقادیر آبسزیک اسید را افزایش می‌دهد و از این طریق مقاومت به سرما را افزایش می‌دهد (Tafazoli and Beyl, 1993).

همچنین تحقیق حاضر نشان داد که رقم لوییا سفید نسبت به سرما حساس‌تر از لوییا قرمز بود و اثر پاکلوبوترازول هم در افزایش مقاومت به سرما در لوییا سفید قوی‌تر از لوییا قرمز بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که پاکلوبوترازول توانایی پاسخ گیاه به تنش سرما را بهبود می‌بخشد و این اثر به ویژه در ارقام حساس‌تر به سرما بیشتر مشهود است و می‌توان از آن برای افزایش تحمل به تنش نسبت به سرما در ارقام حساس‌تر استفاده کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد که پشتیبانی مالی این پژوهش را بر عهده داشتند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

محققان گزارش کرده‌اند که تریازول‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژنی و حفاظت از غشا می‌شوند (Kuan-Hung *et al.*, 2006; Berova *et al.*, 2002). نشان داده شده است که در گیاه فلفل، تنش سرما باعث تغییرات غشایی از جمله کاهش لیپید غشا، افزایش نسبت استرول به فسفولیپید، افزایش اسیدهای چرب اشباع و القا تولید گونه‌های فعال اکسیژنی می‌شود. تیمار گیاهان فلفل با پاکلوبوترازول از این تغییرات جلوگیری می‌کند (Lurie *et al.*, 1994).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، تنش سرما موجب افزایش نشت الکترولیتی غشا و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است که احتمالاً کاهش میزان فتوسنتز را به دنبال دارد و بدین صورت می‌تواند موجب کاهش رشد گیاه شود. در مقابل، پاکلوبوترازول با جلوگیری از تخریب اکسیداتیو غشا و نشت الکترولیتی از آن به پایداری سلول‌ها و غشاهای کلروپلاستی کمک کرد و با حفاظت و افزایش مقادیر کلروفیل از کاهش عملکرد فتوسنتزی تحت تنش سرما جلوگیری کرد و از این نظر آثار منفی سرما روی رشد گیاه را تعدیل کرد. احتمالاً

منابع

- Abdul Jaleel, C., Gopi, R. and Panneerselvam, R. (2008) Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies* 331: 272-277.
- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, 1, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15
- Baninasab, B. (2009) Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. *Scientia Horticulturae* 121(2): 144-148.
- Beck, E., Heim, R. and Hansen, J. (2004) Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Biomedical and Life Science* 9: 449-459.
- Berova, M., Zlatev, Z. and Stoeva, N. (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 28: 75-84.

- Dionsio-sese, M. L. and Tobita, S. (1998) Antioxidant responses of rice seedling to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.
- Fletcher, R. and Hofstra, G. (1988) Triazoles as potential plant protectants. In: Sterol synthesis inhibitors in plant protection (Eds. Berg, D. and Plempel, M.) 321-331. Ellis Horwood Ltd., Cambridge.
- Fletcher, R., Sankhla, N. and Davis, T. (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Reviews* 24: 55-122.
- Hosseini, N. (2004) Pulses in Iran. Nashr Publisher, Tehran (in Persian).
- Hucl, P. (1993) Effects of temperature and moisture stress on the germination of diverse common bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* 73: 697-702.
- Jafari, S. R., Manuchehri Kalantari, Kh. and Turkzadeh, M. (2006) The evaluation of paclobutrazol effects on increase cold hardiness in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* L.). *Iranian Journal of Biology* 19(3): 290-298 (in Persian).
- Khan, M. S. H., Wagatsuma, T., Akhter, A. and Taukraya, K. (2009) Sterol biosynthesis inhibition by paclobutrazol induced greater Aluminum sensitivity in Al-tolerant rice. *American Journal of Plant Physiology* 4(3): 89-99.
- Koh, I. B. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review Plant Biology* 53: 225-245.
- Kooceki, A. and Banayan Avval, M. (1989) Pulses cultivation. Javid Publisher, Jahad Daneshgahi, Mashhad (in Persian).
- Kuan-Hung, L., Fu-Hsiang, P., Shih-Ying, H. and Hsiao-Feng, L. (2006) Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweet potato. *Journal of Plant Growth Regulation* 49: 249-262.
- Lurie, S., Ronen, R., Lipsker, Z. and Aloni, B. (1994) Effects of paclobutrazol and chilling temperatures on lipids, antioxidants and ATPase activity of plasma membrane isolated from green bell pepper fruits. *Physiologia Plantarum* 91: 593-598.
- Machado Neto, N. B. M., Prioli, M. R., Gatti, A. B. and Cardoso, V. J. M. (2006) Temperature effects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Scientiarum Agronomy* 28: 155-164.
- Mahmut Sinan, T., Rahmi, D. and Guleray, A. (2009) Determination of effects of some plant growth regulators (PGRs) on changes of some isoenzymes in bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv Terzibaba) at chilling temperatures: in gel enzyme assays. *Romanian Biotechnological Letters*. 14(6): 4858-4869.
- Rodiño, A. P., Lema, M., Pérez-Barbeito, M., Santalla, M. and De Ron, A. M. (2007) Assessment of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) germplasm for tolerance to low temperature during early seedling growth. *Euphytica* 155: 63-70.
- Sariri, R., Galvani, M., Fotouhi Ghazvini, R. and Jafarian, V. (2011) The effect of cold temperature stress on antifreeze protein production and lipid peroxidation in two citrus species. *Iranian Journal of Plant Biology* 3(7): 97-102.
- Sevillano, L. A. T., Sanchez-Ballesta, M. A., Romojaro, F. E. and Bflores, F. R. (2009) Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Post harvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 555-573.
- Tadjvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, Y. and Hassan Sajedi, R. (2011) Physiological and biochemical responses of page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. *Iranian*

- Journal of Plant Biology 3(9): 1-12.
- Tafazoli, E. and Beyl, C. (1993) Changes in endogenous abscisic acid and cold hardiness in *Actinidia* treated with triazole growth retardants. *Journal of Plant Growth Regulation* 12: 79-83.
- Welling, A. and Palva, E. T. (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum* 127: 167-181.
- Werbrouck, S. P. O. and Debergh, P. C. (1996) Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *Journal of Plant Growth Regulation* 15(2): 81-85.
- White, J. W. and Montes, C. (1993) The influence of temperature on seed germination in cultivars of common bean. *Journal of Experimental Botany* 44: 1795-1800.
- Wilhelm, R. A., Hansjoerg, F. R., Jan, E. G., Hubert, S. A. and Johannes, J. U. (1987) Tetcyclacis and triazole-type plant growth retardants: their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes. *Society of Chemical Industry* 21: 241-252.
- Woronuk, G., VijaJoshua-Otieno, P., Laberge, S., Vandenberg, B. and Bett, K. (2010) Transcriptomic analysis of chilling stress in *Phaseolus* spp. *Environmental and Experimental Botany* 69: 95-104.
- Yadegari, L. Z., Heidari, R. and Carapetian, J. (2007) The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Journal of Biological Sciences* 7(8): 1436-1141.
- Zamani Bahramabadi, E., Rezanejad, F. and Sasan, H. (2013) Effects of cold and short day treatments on dehydrin gene expression in seedlings and regenerated shoots of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 4(14): 35-48.

تأثیر سایکوسل بر فعالیت‌های فتوسنتزی و اسانس گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) تحت تنش خشکی

بابک عندلیبی* و فاطمه نوری

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

چکیده

خشکی به معنای کمبود رطوبت قابل استفاده خاک، مهم‌ترین تنش محیطی است که رشد و توسعه گیاهان را محدود می‌کند. فتوسنتز نیز فرآیند اصلی تعیین‌کننده رشد گیاهان است و توانایی حفظ این فرآیند در شرایط تنش‌های محیطی برای حفظ ثبات رشد مهم است. برای بررسی اثر سایکوسل بر فعالیت‌های فتوسنتزی و اسانس رازیانه تحت تنش خشکی، آزمایشی به صورت اسپلیت پلات با سه سطح خشکی: شاهد، تنش ملایم و تنش شدید به عنوان عامل اصلی و کلرمکوات کلرید (سایکوسل) در سه غلظت: صفر، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان عامل فرعی در چهار تکرار روی گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) اجرا شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که بین مقادیر مختلف محلول پاشی با سایکوسل و تنش خشکی، در سرعت فتوسنتز، شدت تعرق، غلظت دی‌اکسید کربن اتاقک زیر روزنه‌ای، هدایت روزنه‌ای، هدایت مزوفیلی، محتوای نسبی آب برگ (RWC)، اختلاف دمای کانوپی و درصد اسانس اختلاف بسیار معنی‌داری وجود داشت. محلول پاشی گیاه با غلظت سایکوسل ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب تعدیل وضعیت گیاه در برابر تنش خشکی شد و توانست اثر منفی آن را کاهش دهد. کاربرد سایکوسل موجب افزایش معنی‌دار سرعت فتوسنتز و هدایت مزوفیلی و کاهش هدایت روزنه‌ای و سرعت تعرق در شرایط تنش شد. بیشترین درصد اسانس دانه از تیمار تنش ملایم که با غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، محلول پاشی شده بود به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: تبادلات گازی، تنش خشکی، رازیانه، سرعت فتوسنتز

مقدمه

نوین در بهبود کمی و کیفی محصولات کشاورزی استفاده از هورمون‌های رشد گیاهی است. کلرومکوات کلرید یا سایکوسل یکی از مشتقات کولین و از گروه ترکیبات اونیومی است (Emam and Moaid, 2000).

یکی از اهداف مهم در کشاورزی پیشرفته افزایش عملکرد در واحد سطح و به حداقل رساندن ضایعات و خسارات ناشی از عوامل نامساعد است. از رهیافت‌های

کلمکوات کلرید مانع فعالیت آنزیم انت کائورن سنتاز در مسیر بیوستنز هورمون جیبرلیک اسید می‌شود و با کاهش این هورمون ارتفاع گیاهان را کاهش می‌دهد (Jaana et al., 2002). عملکرد بیشتر دانه در گیاهان تیمار شده با سایکوسل به خاطر رشد بیشتر ریشه، افزایش مقاومت روزنه‌ای و پتانسیل آب بیشتر در برگ است (Parida and Das, 2005). سایکوسل با افزایش تعداد و بقای پنجه‌ها و همچنین سطح برگ بیشتر در غلات باعث افزایش فتوستنز می‌شود و مواد پرورده بیشتری به سمت ریشه‌ها انتقال می‌یابد موجب و ریشه‌دهی بیشتر می‌شود (Sherif et al., 2007). از سوی دیگر، سایکوسل در ساختمان خود دارای یک گروه آمونیومی است که ممکن است ازت موجود در گروه آمونیوم آن پس از تجزیه در مسیر فرآیندهای متابولیسمی آزاد شود و به عنوان منبع نیتروژنی در دسترس گیاه قرار گیرد و به تحریک رشد و شاخص‌های وابسته به آن منجر گردد (Ma and Smith, 1992). پیش‌تیمار بذور ذرت با سالیسیلیک اسید از طریق افزایش در مقدار آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از جمله آسکوربات و ترکیبات فنلی و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو و نشت یونی را کاهش و باعث افزایش شاخص‌های رشد گردید (Mamnoei and Seyed Sharifi, 2010). با بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک در گیاه *Lepidium sativum* مشاهده شد که این ترکیب موجب افزایش معنی‌دار طول ریشه و ساقه شد اما میزان آنتوسیانین و کاروتنوئیدها در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد کاهش یافت (Hashemi et al., 2010). آزمایش انجام شده روی گیاه

Cymbopogon citratus نشان داد که محلول پاشی با سایکوسل سبب افزایش معنی‌دار را در میزان روغن فرار قسمت‌های هوایی گیاه و درصد سیترال آن در مقایسه با شاهد شد، به طوری که تیمار ۵۰۰ ppm سایکوسل بیشترین عملکرد روغن فرار را نسبت به بقیه تیمارها داشت (Ellabban, 1978). مصرف ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به معنی‌داری میزان آتروپین و اسکوپولامین ریشه‌های موبین ترا ریخت و گیاهچه‌های *Atropa belladonna* شد (Ahmadian Chashmi et al., 2011). مصرف سایکوسل در شرایط تنش خشکی با افزایش مقاومت روزنه‌ای و محتوای نسبی آب (RWC) سبب خنثی شدن آثار منفی خشکی در ارقام مختلف زیتون گردید (Nejadsahebi et al., 2010). سایکوسل به عنوان فعال‌کننده متابولیسم سنتز فلاونوئیدها عمل می‌کند و تیمار گندم سیاه با آن به طور معنی‌داری سنتز متابولیت‌های ثانویه را با فعال نمودن آنزیم فینیل‌آلانین-آمونیلاز افزایش داد (Smirnov et al., 2012). رشد و فتوستنز گیاهان، تحت تأثیر شرایط محیطی نظیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. توانایی زنده ماندن گیاه و ادامه رشد و نمو و فتوستنز در تنش‌های محیطی به پتانسیل ژنتیکی گیاه وابسته است که به صورت پاسخ‌های فیزیولوژیک و مولکولی بروز می‌کند. برخی مواد تنظیم‌کننده رشد خارج از گیاه می‌توانند گیاه را از طریق فتوستنز بیشتر برای تحمل به تنش تواناتر سازند (Geoffrey, 2011). مصرف سایکوسل در گیاه *Pelargonium graveolens* با کاهش رشد و ارتفاع ساقه‌ها مواد فتوستزی بیشتری را به سمت سنتز اسانس انتقال داد (Rabbi Angourani et al., 2013).

کلمکوات کلرید مانع فعالیت آنزیم انت کائورن سنتاز در مسیر بیوستنز هورمون جیبرلیک اسید می‌شود و با کاهش این هورمون ارتفاع گیاهان را کاهش می‌دهد (Jaana et al., 2002). عملکرد بیشتر دانه در گیاهان تیمار شده با سایکوسل به خاطر رشد بیشتر ریشه، افزایش مقاومت روزنه‌ای و پتانسیل آب بیشتر در برگ است (Parida and Das, 2005). سایکوسل با افزایش تعداد و بقای پنجه‌ها و همچنین سطح برگ بیشتر در غلات باعث افزایش فتوستنز می‌شود و مواد پرورده بیشتری به سمت ریشه‌ها انتقال می‌یابد موجب و ریشه‌دهی بیشتر می‌شود (Sherif et al., 2007). از سوی دیگر، سایکوسل در ساختمان خود دارای یک گروه آمونیومی است که ممکن است ازت موجود در گروه آمونیوم آن پس از تجزیه در مسیر فرآیندهای متابولیسمی آزاد شود و به عنوان منبع نیتروژنی در دسترس گیاه قرار گیرد و به تحریک رشد و شاخص‌های وابسته به آن منجر گردد (Ma and Smith, 1992). پیش‌تیمار بذور ذرت با سالیسیلیک اسید از طریق افزایش در مقدار آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از جمله آسکوربات و ترکیبات فنلی و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو و نشت یونی را کاهش و باعث افزایش شاخص‌های رشد گردید (Mamnoei and Seyed Sharifi, 2010). با بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک در گیاه *Lepidium sativum* مشاهده شد که این ترکیب موجب افزایش معنی‌دار طول ریشه و ساقه شد اما میزان آنتوسیانین و کاروتنوئیدها در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد کاهش یافت (Hashemi et al., 2010). آزمایش انجام شده روی گیاه

(Mamnoei and Seyed Sharifi, 2010).
 با مطالعه اثر تنش خشکی روی گیاه *Ctenanthe setosa* مشاهده شد که وقتی بوته‌های این گیاه تحت تنش شدید خشکی قرار گرفتند، RWC برگ از ۹۴ درصد به ۷۴ درصد کاهش یافت. کاهش پتانسیل آب برگ و RWC در واقع با هدایت روزنه‌ای و سرعت فتوسنتز کمتر همراه بوده است و در نهایت، باعث کاهش عملکرد شد (Saglam *et al.*, 2008).
 با بررسی تأثیر محدودیت آب روی گیاه دارویی *Cajanus cajan* مشاهده شد که هر چه بر شدت تنش خشکی افزوده شود، از اختلاف بین دمای برگ و دمای هوا کاسته شده و بر دمای کانویپی اضافه می‌شود و در شرایط تنش خشکی شدید این اختلاف ($T_c - T_a$) به صفر نزدیک می‌شود (Patel *et al.*, 2001).
 با مطالعه تأثیر تنش خشکی بر شش ژنوتیپ جو مشاهده شد که کمبود آب موجب کاهش محتوای کلروفیل و عملکرد شد. اما دمای آسمانه (ΔT) در تمامی ژنوتیپ‌های مطالعه شده به طور معنی‌داری افزایش یافت (Mamnoei and Seyed Sharifi, 2010).
 تعیین توان فتوسنتزی گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) در شرایط تنش خشکی و تعیین سهم عوامل روزنه‌ای و غیرروزنه‌ای در کاهش فتوسنتز برای شناسایی ویژگی‌های فتوسنتزی این گیاه اهمیت فراوانی دارد. هدف از پژوهش حاضر، تعیین نقش برخی عوامل مهم روزنه‌ای و غیرروزنه‌ای و اهمیت نسبی آنها در شرایط تنش خشکی و بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر رفع آثار کم آبی و بهبود سیستم فتوسنتزی جهت به دست آوردن عملکرد کمی و کیفی بالا در شرایط تنش بود.

فتوسنتز از دو طریق تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد: الف) بسته شدن روزنه‌ها دسترسی کلروپلاست را به CO_2 محدود می‌کند؛ ب) پایین بودن پتانسیل آب تأثیر مستقیم بر ساختمان اجزای دخیل در فرآیند فتوسنتز دارد (Ramachandra Reddy *et al.*, 2004).
 عموماً پذیرفته شده است که محدودیت روزنه‌ای عامل اصلی تعیین‌کننده کاهش فتوسنتز در شرایط تنش خشکی است (Cornic, 2000).
 بسته شدن روزنه، کاهش ورود دی‌اکسید کربن (CO_2) به درون برگ و کاهش فتوسنتز خالص را در پی خواهد داشت (Andalibi, 2009).
 تنظیم تعرق برگ از طریق بسته شدن روزنه‌ها ممکن است به عنوان سازوکار مقاومت به خشکی عمل نماید، اما اجتناب از تنش که بدین ترتیب حاصل می‌شود ممکن است سبب توقف فتوسنتز شود و نامطلوب باشد، عدم کارایی دستگاه فتوسنتزی و آسیب دیدن آن در اثر کمبود آب به مصرف نشدن CO_2 و افزایش غلظت آن منجر می‌شود (Ashraf and Harris, 2013).
 با افزایش شدت تنش، هدایت مزوفیلی بیش از هدایت روزنه‌ای تحت تأثیر قرار می‌گیرد، لذا با وجود کاهش هدایت روزنه‌ای و محدود شدن ورود CO_2 به داخل روزنه‌ها به علت افت کارایی کربوکسیلاسیون و کاهش مصرف CO_2 ، غلظت آن در زیر اطاقک روزنه‌ای افزایش می‌یابد (Siosemardeh *et al.*, 2005؛ Yamori *et al.*, 2013).
 با بررسی تأثیر تنش خشکی روی شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در گیاه جو مشاهده شد که با افزایش محدودیت آب آبیاری، میزان کلروفیل و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II به دلیل بازدارندگی نوری کاهش معنی‌داری نشان داد

مواد و روش‌ها

صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار اجرا گردید. زمین محل آزمایش دارای خاکی با بافت لومی شنی و اسیدیته برابر با ۷/۵۴ بود (جدول ۱).

برای بررسی اثر محلول پاشی سایکوسل بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و میزان اسانس گیاه دارویی رازیانه تحت شرایط تنش خشکی، آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، به

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

عمق نمونه (سانتی‌متر)	رطوبت وزنی در حد FC (درصد)	جرم مخصوص (گرم بر سانتی‌متر مکعب)	بافت خاک	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	ازت کل (درصد)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاسیم قابل جذب (ppm)	هدایت الکتریکی (میلی‌موس بر سانتی‌متر)	اسیدیته گل اشباع
۰-۳۰	۲۲/۵۶	۱/۵۶۴	لومی شنی	۱۷	۳۱	۵۲	۰/۱۲	۱۳/۴	۲۶۷	۱۳/۸۶	۷/۵۴

میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و دمای 2 ± 25 درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد (Shah, 2011). برای تعیین هدایت مزوفیلی (کارآیی کربوکسیلاسیون = CE) از رابطه ۱ استفاده شد (Ashraf et al., 2002).

$$\text{رابطه ۱: } CE (g_m) = P_N / g_s$$

برای تعیین اختلاف دمای کانوپی در مرحله گل‌دهی کامل، زمانی که گیاهان تحت تنش‌های مورد نظر قرار گرفتند، دمای برگ تمامی تیمارها در ساعت ۱۳، با دماسنج لیزری (مدل Reytek MT4، شرکت Minitemp، چین) اندازه‌گیری شد. در هر بار اندازه‌گیری ۱۰ نقطه به صورت تصادفی انتخاب و به سمت پوشش گیاهی نشانه‌روی شد. برای اندازه‌گیری دمای محیط از دماسنج دیجیتالی استفاده شد. دماسنج در ارتفاع حدود ارتفاع پوشش گیاهی در مزرعه قرار داده شد، سپس اختلاف دمای کانوپی برای هر کرت از رابطه ۲ به دست آمد (Siddique et al., 2000).

$$\text{رابطه ۲: } \Delta T(^{\circ}C) = T_c - T_a$$

برای اندازه‌گیری RWC برگ در مرحله گل‌دهی

تنش خشکی به عنوان عامل اصلی در سه سطح: الف) شاهد: آبیاری مجدد در ظرفیت زراعی ۹۰ درصد؛ ب) تنش ملایم: آبیاری مجدد زمانی که ۳۰ درصد آب قابل استفاده از خاک خارج شد و پ) تنش شدید: آبیاری مجدد ۹۰ درصد، زمان خارج شدن آب قابل استفاده از خاک، بررسی شد که از آغاز گل‌دهی تا رسیدگی فیزیولوژیک اعمال شد. محلول پاشی سایکوسل به عنوان عامل فرعی در یک مرحله، در سه سطح: ۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مرحله گل‌دهی انجام شد. با توجه به منحنی رطوبتی خاک، پتانسیل آب خاک در ظرفیت زراعی ۹۰ درصد برابر با ۰/۳۷-، تنش ملایم برابر با ۰/۴۸- و در تنش شدید ۱/۲۵- مگاپاسکال بود. در مرحله گل‌دهی پس از اعمال تنش و محلول پاشی، از هر کرت ۱۰ بوته به طور تصادفی انتخاب و تبادلات گازی سه برگ بالایی هر بوته با استفاده از دستگاه تحلیل‌گر گاز مادون قرمز (مدل LCA4، شرکت ADC Bioscientific، انگلستان) در ساعت ۱۱ تا ۱۲ پیش از ظهر و در شدت نوری معادل ۱۲۰۰-۱۴۰۰

در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۲). تیمار شاهد در عدم محلول پاشی سایکوسل و تنش شدید با محلول پاشی ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل به ترتیب با ۰/۴۱ و ۰/۱۸ مول H_2O بر متر مربع بر ثانیه، بیشترین و کمترین هدایت روزنه‌ای را به خود اختصاص دادند (شکل ۱). با افزایش غلظت محلول پاشی سایکوسل روند کاهش در میزان هدایت روزنه‌ای تیمارها مشاهده شد، هر چند این کاهش در گیاهان تحت تنش اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. نتایج آزمایش نشان داد که سایکوسل در شرایط تنش ملایم خشکی توانست با بسته‌تر نگه داشتن روزنه‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کمبود آب گیاه را جبران کند، RWC گیاه را افزایش دهد و از این طریق از صدمه به گیاه جلوگیری کند. بنابراین، استفاده از سایکوسل در شرایط تنش خشکی می‌تواند با افزایش مقاومت روزنه‌ای، میزان هدر رفت آب گیاه را کاهش دهد (Saei *et al.*, 2006). مشخص شده است که وضعیت آبی برگ با هدایت روزنه‌ای همبستگی دارد (Ashraf and Harris, 2013). گیاهان تحت تنش، توسط تنظیم روزنه‌ای از اتلاف زیاد آب از طریق تعرق جلوگیری می‌کنند (Chinnusamy, 2004). بر اساس تحقیقات انجام شده روی سه کولتیوار درخت زیتون، کاربرد ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل در شرایط تنش خشکی، موجب افزایش میزان RWC برگ و مقاومت روزنه‌ای و از این طریق موجب تعدیل اثر منفی تنش خشکی می‌شود (Nejadsahebi *et al.*, 2010) که با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد.

همزمان با اندازه‌گیری تبادلات گازی در ساعت ۱۱ صبح، از هر واحد آزمایشی ۱۰ برگ کامل (بالاترین برگ هر بوته) انتخاب و برگ‌ها بلافاصله در فویل آلومینیومی پیچیده و در کیسه پلاستیکی درون یخ به آزمایشگاه منتقل و وزن تر آنها تعیین شد. سپس، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در آب مقطر قرار داده شد و وزن آماسیده آنها تعیین گردید. آنگاه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در آون قرار گرفتند و وزن خشک آنها توزین شد. RWC از رابطه ۳ محاسبه شد (Merah, 2001).

$$RWC = [(FW-DW) / (TW-DW)] \times 100 \quad \text{رابطه ۳}$$

برای استخراج اسانس، از بذره‌های خشک شده در سایه و تحت جریان هوا، از روش تقطیر با آب و از دستگاه کلونجر (مدل جایمنند-رضایی، شرکت گلدیس، ایران) استفاده شد. برای این منظور، ۵۰ گرم از دانه‌های خشک شده گیاه (با احتساب میزان رطوبت موجود در دانه‌ها) به همراه یک لیتر آب مقطر در بالن دستگاه قرار گرفت. اسانس‌گیری پس از آسیاب نمودن نمونه‌ها با حرارت دادن بالن به مدت سه ساعت انجام شد (Andalibi, 2009).

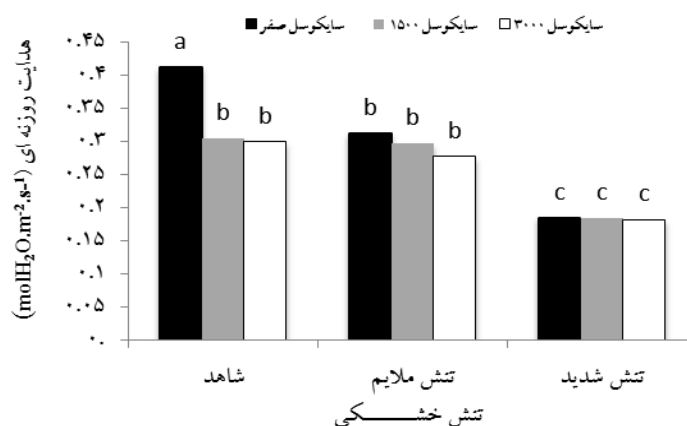
داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد، برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

هدایت روزنه‌ای: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد تنش خشکی و محلول پاشی با سایکوسل اثر معنی‌داری بر هدایت روزنه‌ای داشت. همچنین اثر متقابل این دو تیمار نیز تأثیر معنی‌داری

جدول ۲- جدول میانگین مربعات اثر سایکوسل بر فعالیت‌های فتوسنتزی و اسانس رازیانه تحت تنش خشکی. **، * و NS به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌دار.

منابع تغییرات	درجه آزادی	هدایت روزنه‌ای	سرعت تعرق	سرعت فتوسنتز	CO ₂ زیر روزنه (ci)	هدایت مزوفیلی	ΔT	RWC برگ	درصد اسانس
بلوک	۳	۰/۰۰۰۸ ^{NS}	۱/۰۶ ^{NS}	۰/۴۹ ^{NS}	۴۵/۹۸ ^{NS}	۰/۰۰۱ ^{NS}	۰/۶۴*	۲/۸۱ ^{NS}	۰/۰۰۷ ^{NS}
تنش خشکی	۲	۰/۰۰۷۶ ^{**}	۳۷/۰۵ ^{**}	۲۹۴/۶۵ ^{**}	۴۶۳۵۱/۵۲ ^{**}	۰/۰۳ ^{**}	۴۱/۰۳ ^{**}	۴۶۶۵/۱۹ ^{**}	۱/۱۲ ^{**}
خطای a	۶	۰/۰۰۰۸	۰/۵۹	۰/۵۴	۷۶/۹۵	۰/۰۹۵	۰/۲۴	۱۸/۶۷	۰/۰۰۸
سایکوسل	۲	۰/۰۰۰۸ ^{**}	۱۲/۹۸ ^{**}	۲۹/۵۴ ^{**}	۲۷۶/۰۹ ^{**}	۰/۰۲ ^{**}	۱/۶۹ ^{**}	۲۰۱/۴۴ ^{**}	۰/۰۰۷ ^{**}
تنش خشکی × سایکوسل	۴	۰/۰۰۴ ^{**}	۱/۲۰*	۳/۳۶ ^{**}	۱۷/۹۱ ^{NS}	۰/۰۳ ^{**}	۰/۳ ^{NS}	۱۷/۲۳ ^{NS}	۰/۰۰۱ ^{**}
خطای آزمایشی	۱۸	۰/۰۰۶	۰/۲۹	۰/۴۲	۷/۵۳	۰/۰۰۱	۰/۱۷	۹/۴۱	۰/۴۱
ضریب تغییرات (درصد)		۹/۱۸	۶/۸۵	۱۴/۲۳	۷/۴۹	۱۳/۹۱	۱۶/۹۶	۴/۱۵	۹/۳۴



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و میزان سایکوسل بر هدایت روزنه‌ای در گیاه رازیانه. ستون‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

هدایت روزنه‌ای روند مشابهی را در تیمارها نشان داد، با این تفاوت که شدت کاهش هدایت روزنه‌ای در مقایسه با میزان تعرق بیشتر بود (شکل ۲). زیاد بودن میزان تعرق نسبت به جذب CO₂ به دو عامل بستگی داشت: الف) شیب غلظت آب از داخل به بیرون برگ پنج برابر شیب CO₂ از بیرون به داخل برگ است. علت این امر پایین بودن غلظت CO₂ در هوا و بالا بودن غلظت بخار آب در فضای داخلی برگ است. ب) CO₂ آهسته‌تر از آب در هوا انتشار می‌یابد (مولکول CO₂ بزرگتر از H₂O و دارای ضریب انتشار

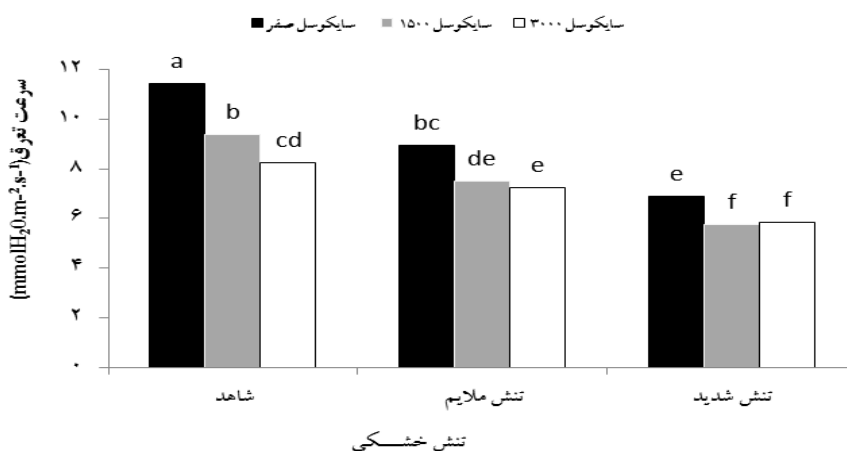
سرعت تعرق: بر اساس جدول تجزیه واریانس، اثر متقابل تنش خشکی و میزان سایکوسل تأثیر معنی‌داری بر سرعت تعرق در سطح احتمال ۵ درصد داشت (جدول ۲). اثر متقابل تیمار شاهد و عدم محلول پاشی سایکوسل با ۱۱/۴۲ و تنش شدید و ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل با ۵/۷۶ میلی مول H₂O بر متر مربع بر ثانیه، به ترتیب بیشترین و کمترین سرعت تعرق را به خود اختصاص دادند. در تمامی سطوح آبیاری، با افزایش غلظت سایکوسل، سرعت تعرق به طور معنی‌داری کاهش یافت. مقایسه میانگین میزان تعرق و

کمترین هدایت مزوفیلی را به خود اختصاص دادند (شکل ۳). افزایش غلظت سایکوسل از صفر به ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر در شرایط بدون تنش موجب افزایش معنی دار در هدایت مزوفیلی گردید، در شرایط تنش ملایم نیز این افزایش زمانی که غلظت سایکوسل از ۱۵۰۰ به ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش یافت محسوس بود. در تنش شدید افزایش جزئی هدایت مزوفیلی با افزایش غلظت سایکوسل مشاهده شد اما این افزایش از لحاظ آماری معنی دار نبود.

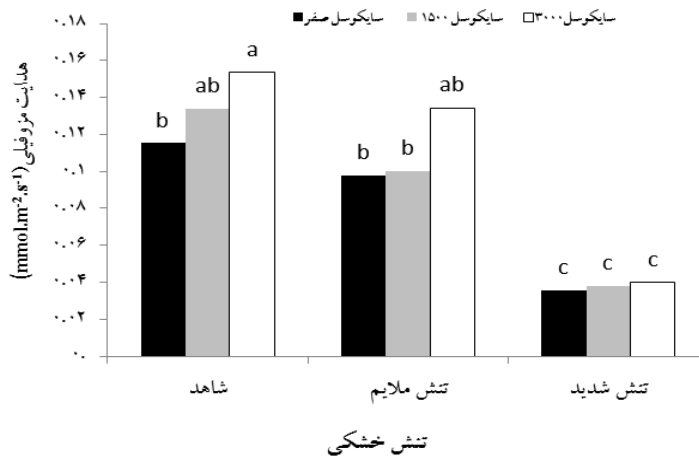
با توجه به کاهش فتوستتز در شرایط تنش خشکی و کاهش شدیدتر هدایت مزوفیلی در مقایسه با هدایت روزنه‌ای می‌توان گفت که اثر محدود کنندگی مقاومت روزنه‌ای در شرایط تنش، کمتر از مقاومت مزوفیلی بوده است، بنابراین در صورتی که کاهش فتوستتز با افزایش یا ثبات غلظت CO_2 درون روزنه‌ای همراه باشد می‌توان گفت که عوامل غیرروزنه‌ای محدود کننده فتوستتز هستند (Siosemardeh *et al.*, 2005). پژوهشگران تولید پایدار را مستلزم تعرق، هدایت روزنه‌ای و هدایت مزوفیلی بالا در شرایط تنش می‌دانند (Omea *et al.*, 2007).

کوچکتری است). علاوه بر این، مسیر CO_2 طولانی‌تر است، زیرا CO_2 بایستی پیش از آن که در کلروپلاست جذب شود، از غشای پلاسما، سیتوپلاسم و غشای کلروپلاست عبور کند. این غشاها به طور قابل توجهی مقاومت مسیر انتشار CO_2 را افزایش می‌دهند (Taiz and Zeiger, 2002). کاهش میزان تعرق در تیمارهای تحت تنش به علت بسته شدن روزنه‌ها و کاهش هدایت روزنه‌ای است که علاوه بر تولید ABA در ریشه و ارسال آن به برگ‌ها، در اثر کاهش پتانسیل آماسی در برگ نیز به وجود می‌آید و به احتمال زیاد از طریق ABA تولید شده در خود برگ‌ها عمل می‌کند (Yamori *et al.*, 2013). سایکوسل نیز با افزایش مقاومت روزنه‌ای میزان تعرق را کاهش می‌دهد و از هدر رفت آب جلوگیری می‌کند (Saei *et al.*, 2006).

هدایت مزوفیلی: اثر متقابل تنش خشکی و سایکوسل تأثیر معنی داری بر هدایت مزوفیلی در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۲). تیمار شاهد با محلول پاشی غلظت ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل و تنش شدید بدون محلول پاشی سایکوسل به ترتیب با ۰/۱۵۳ و ۰/۰۳۵ میلی مول بر متر مربع بر ثانیه، بیشترین و



شکل ۲- مقایسه میانگین آثار متقابل تنش خشکی و میزان سایکوسل بر سرعت تعرق در گیاه رازیانه. ستون‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.



شکل ۳- مقایسه میانگین آثار متقابل تنش خشکی و میزان سایکوسل بر هدایت مزوفیلی در گیاه رازیانه. ستون‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

طور معنی‌داری در گیاه کاهش پیدا کرده است. **سرعت فتوسنتز:** اثر متقابل تنش خشکی و سایکوسل تأثیر معنی‌داری بر صفت سرعت فتوسنتز در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۲). تیمار شاهد با محلول پاشی غلظت ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل و تنش شدید بدون محلول پاشی سایکوسل به ترتیب با ۲۱/۱۰ و ۹/۲۸ میکرومول CO₂ بر متر مربع بر ثانیه، بیشترین و کمترین سرعت فتوسنتز را داشتند (شکل ۴). با افزایش تنش خشکی، سرعت فتوسنتز کاهش معنی‌داری پیدا کرد به طوری که در تیمار تنش شدید، سرعت فتوسنتز ۴۸ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. افزایش غلظت سایکوسل در تیمار تنش ملایم موجب افزایش معنی‌دار در سرعت فتوسنتز شد و توانست تا حدی آثار منفی تنش خشکی را جبران کند. به طوری که تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد با محلول پاشی ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل با تیمار تنش ملایمی که با غلظت ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر سایکوسل محلول پاشی شده بود وجود نداشت. در تنش شدید نیز زمانی که غلظت سایکوسل از صفر به ۳۰۰۰ میلی گرم

غلظت CO₂ زیر روزنه (Ci): غلظت CO₂

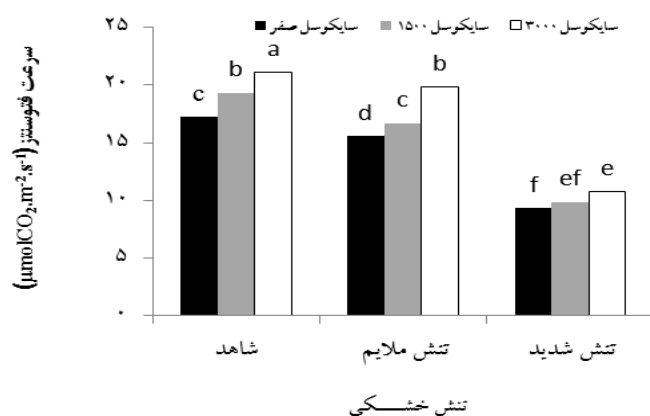
زیر روزنه‌ای به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آبیاری و محلول پاشی با سایکوسل قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین و کمترین مقادیر غلظت CO₂ زیر روزنه‌ای به ترتیب از تیمار تنش شدید و شاهد به میزان ۲۵۵/۵ و ۱۴۳/۲۹ میکرومول CO₂ بر متر مربع بر ثانیه به دست آمد. محلول پاشی سایکوسل به میزان ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر با ۱۷۹/۳۴ کمترین و تیمار شاهد با ۱۸۸/۹۱ میکرومول CO₂ بر متر مربع بر ثانیه بیشترین غلظت CO₂ زیر روزنه را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). عدم کارایی دستگاه فتوسنتز و آسیب دیدن آن در اثر کمبود آب به عدم مصرف CO₂ و افزایش غلظت آن منجر شد. افزایش Ci با وجود کاهش شدید هدایت روزنه‌ای در شرایط تنش را می‌توان به کاهش ظرفیت فتوسنتزی کلروپلاست‌ها یا کاهش بازده کربوکیلاسیون نسبت داد (Taiz and Zeiger, 2002) که در این بین، سایکوسل موجب افزایش سرعت فتوسنتز و هدایت مزوفیلی شده، با مصرف CO₂ جهت انجام عمل فتوسنتز، غلظت آن نسبت به تیمار شاهد به

آمونومی، مانند سایکوسل، می‌توان به افزایش میزان فتوسنتز خالص در گیاهان اشاره کرد، افزایش فتوسنتز گیاهچه‌های تیمار شده با کلرومکوات کلراید در گیاهان متعددی گزارش شده است که علت آن را افزایش غلظت کلروفیل، قند ۵ کربنی ریبولوز دی فسفات و کوچکتر شدن سلول‌ها عنوان می‌کنند (Smirnov *et al.*, 2012). بنابراین، سایکوسل با افزایش هدایت مزوفیلی و کاهش شدت تعرق گیاه تا حد زیادی موجب بهبود فعالیت دستگاه فتوسنتزی گیاه در برابر تنش شد و از این طریق توانست سرعت فتوسنتز را افزایش دهد.

در لیتر افزایش یافت موجب افزایش سرعت فتوسنتز شد. تنش ملایم خشکی، فتوسنتز را عمدتاً از طریق عوامل قابل برگشت روزنه‌ای کاهش داد، اما با تشدید تنش، عوامل غیرروزنه‌ای هم مزید بر علت شدند. کاهش سرعت فتوسنتز در تنش‌های شدید خشکی عمدتاً تحت تأثیر عوامل غیرروزنه‌ای بود (Chai *et al.*, 2011; Ashraf and Harris, 2013). Mishra و همکاران (۲۰۰۶) اظهار داشتند که سرعت فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای یک روز پس از قطع آبیاری تغییر نکرد اما از روز دوم پس از اعمال تنش به سرعت شروع به کاهش نمود. از آثار ثانویه ترکیبات

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سایکوسل بر فعالیت‌های فتوسنتزی و اسانس رازیانه تحت تنش خشکی. میانگین‌های هر ستون‌ها که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

تیمار	هدایت روزنه‌ای (میلی مول H ₂ O بر متر مربع بر ثانیه)		سرعت فتوسنتز (میلی مول H ₂ O بر متر مربع بر ثانیه)		سرعت تعرق (میلی مول H ₂ O بر متر مربع بر ثانیه)		CO ₂ زیر روزنه (میلی مول H ₂ O بر متر مربع بر ثانیه)		هدایت مزوفیلی (میلی مول H ₂ O بر متر مربع بر ثانیه)	
	ΔT (درجه سانتیگراد)	RWC (درصد)	اسانس (درصد)	اسانس (درصد)	اسانس (درصد)	اسانس (درصد)	اسانس (درصد)	اسانس (درصد)	اسانس (درصد)	
شاهد	۰/۳۳ ^a	۹/۶۷ ^a	۱۹/۲۱ ^a	۱۴۳/۲۹ ^c	۰/۱۳ ^a	۷/۸۲ ^c	۸۸/۶۰ ^a	۱/۵۶ ^b		
تنش ملایم	۰/۲۹ ^b	۷/۸۹ ^b	۱۷/۳۴ ^b	۱۵۳/۰۸ ^b	۰/۱۱ ^b	۶/۱۷ ^b	۸۱/۲۵ ^b	۱/۹۱ ^a		
تنش شدید	۰/۱۸ ^c	۶/۱۶ ^c	۹/۸۵ ^c	۲۵۵/۵ ^a	۰/۰۳ ^c	۴/۱۳ ^a	۵۱/۴۱ ^c	۱/۳۰ ^c		
صفر	۰/۳۰ ^a	۹/۰۸ ^a	۱۴/۰۱ ^c	۱۸۸/۹۱ ^a	۰/۰۸ ^c	۶/۴۵ ^b	۶۹/۵۰ ^c	۱/۵۷ ^c		
سایکوسل ۱۵۰۰	۰/۲۶ ^b	۷/۵۴ ^b	۱۵/۲۶ ^b	۱۸۳/۶۱ ^b	۰/۰۹ ^b	۵/۹۷ ^a	۷۴/۱۶ ^b	۱/۵۸ ^b		
۳۰۰۰	۰/۲۵ ^b	۷/۱۰ ^b	۱۷/۱۳ ^a	۱۷۹/۳۴ ^c	۰/۱ ^a	۵/۷۰ ^a	۷۷/۶۶ ^a	۱/۶۲ ^a		



شکل ۴- مقایسه میانگین آثار متقابل تنش خشکی و میزان سایکوسل بر سرعت فتوسنتز در گیاه رازیانه. ستون‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

اختلاف دمای کانوپی (ΔT): تجزیه واریانس نشان داد که دمای کانوپی به طور معنی داری تحت تأثیر تیمارهای آبیاری و محلول پاشی سایکوسل قرار گرفت. اثر متقابل این دو معنی دار نبود (جدول ۲). بیشترین و کمترین مقادیر اختلاف دمای کانوپی به ترتیب از تیمار تنش شدید و شاهد به میزان $4/13$ - و $7/82$ - درجه سانتیگراد حاصل شد که نشانگر اختلاف زیاد دمای برگ گیاهان شاهد با دمای محیط بود (جدول ۳). تعرق روزنه‌ای نقش اصلی را در تنظیم دمای برگ دارد، بنابراین زمانی که گیاه با کمبود آب مواجه نباشد میزان تعرق گیاه بالا است و با انجام عمل تعرق می‌تواند دمای خود را تعدیل کند. اما در شرایط تنش به علت کاهش تعرق گیاه و بسته شدن روزنه‌ها دمای برگ بالا رفته، اختلاف اندکی با دمای محیط خواهد داشت. محلول پاشی سایکوسل به میزان 3000 میلی گرم در لیتر با $5/70$ - بیشترین و تیمار بدون محلول پاشی با $6/45$ - درجه سانتیگراد کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. اگر چه در بررسی حاضر محلول پاشی با سایکوسل باعث کاهش هدایت روزنه‌ای و سرعت تعرق و در نتیجه کاهش هدر رفت آب از گیاه گردید، اما موجب بالا رفتن دمای برگ‌ها شد، این افزایش به حدی نبود که گیاه با تنش حرارتی آسیب ببیند. در گیاهانی که تحت شرایط مناسب آبی قرار دارند میزان تعرق و در نتیجه آب تبخیر شده از برگ‌ها بالا است که به دفع انرژی خورشیدی جذب شده توسط برگ‌ها منجر می‌گردد و دمای کانوپی پایین می‌آید. اما در گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار دارند و روزنه‌ها در اثر کمبود آب بسته است، تبخیر در خنک شدن برگ‌ها نقشی ندارد و عمده تلفات گرمایی از طریق

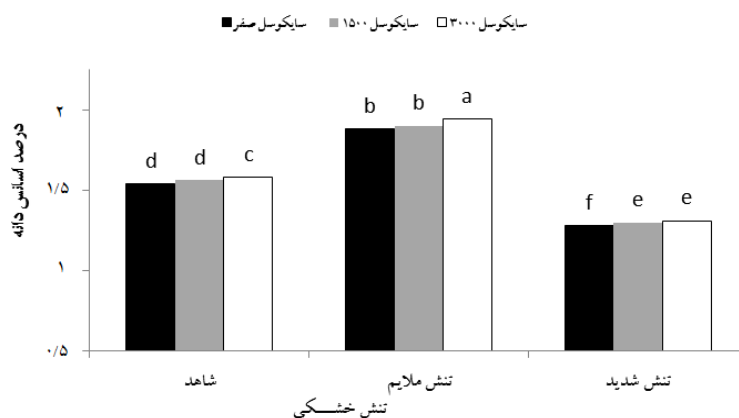
تلفات محسوس گرمایی صورت می‌گیرد که کار آبی چندانی در خنک کردن برگ‌ها ندارد و در نتیجه دمای کانوپی افزایش می‌یابد. افزایش دمای کانوپی تحت شرایط تنش در سایر گیاهان نیز تأیید شده است (Erdem *et al.*, 2006).

محتوای نسبی آب (RWC): تنش خشکی و سایکوسل تأثیر معنی داری ($P \leq 0/01$) بر RWC داشتند اما اثر متقابل این دو معنی دار نشد (جدول ۲). بیشترین و کمترین مقادیر RWC را به ترتیب تیمار شاهد و تنش شدید به میزان $88/60$ و $51/41$ درصد به خود اختصاص دادند. محلول پاشی 3000 میلی گرم در لیتر سایکوسل، RWC را افزایش داد ($77/66$ درصد) و در شاهد معادل کاهش داشت ($69/50$ درصد) (جدول ۳). به خوبی مشخص شده است که تنش خشکی، RWC، پتانسیل آب برگ و پتانسیل اسمزی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. کاهش RWC برگ می‌تواند به علت کاهش میزان جذب آب از خاک توسط ریشه‌ها یا به علت تبخیر بیشتر از روزنه‌ها باشد (Ma *et al.*, 2006). بالا بودن RWC در شرایط کم آبی می‌تواند با رفتار روزنه‌ها و سیستم ریشه‌ای گیاه در ارتباط باشد، زیرا حفظ رطوبت درونی محتوای گیاه نیازمند داشتن ریشه‌های عمیق برای جذب آب دارد (Hirayama *et al.*, 2006). سایکوسل در شرایط تنش خشکی توانست با بسته‌تر نگه داشتن روزنه‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای از اتلاف آب گیاه جلوگیری کند و RWC برگ را افزایش دهد و از این طریق از صدمه به گیاه جلوگیری کند. بنابراین، استفاده از سایکوسل در شرایط تنش خشکی می‌تواند با افزایش مقاومت روزنه‌ای و احتمالاً توسعه بیشتر سیستم ریشه‌ای، میزان هدر رفت آب از گیاه را کاهش و جذب آب را

افزایش دهد (Saei et al., 2006).

درصد اسانس: اثر متقابل تنش خشکی و سایکوسل تأثیر معنی داری بر درصد اسانس در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۲). بیشترین درصد اسانس به میزان ۱/۹۴ درصد مربوط به تیمار تنش ملایمی بود که با غلظت ۳۰۰۰ میلی گرم سایکوسل محلول پاشی شده بود و کمترین مقدار درصد اسانس با ۱/۲۸ درصد از تیمار تنش شدید بدون محلول پاشی سایکوسل به دست آمد (شکل ۵). به طوری که تیمار تنش ملایم نسبت به تیمار شاهد ۲۲ درصد افزایش اسانس داشت. تشکیل و تجمع اسانس در گیاهان تحت شرایط محیطی خشک روند افزایشی دارد (Rajala, 2003). اعتقاد بر این است که سنتز بیشتر متابولیت‌های ثانویه در تحمل گیاهان تحت شرایط تنش می‌تواند نقش داشته باشد (Safi khani et al., 2007).

بر اساس فرضیه موازنه رشد-تمایز (Growth Differentiation Balance Hypothesis) هر کمبودی که رشد را بیش از فتوسنتز محدود کند، تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد. تا زمانی که آب در دسترس گیاه است گیاه کربن را ترجیحاً برای رشد اختصاص می‌دهد. اما با کاهش آب آبیاری میزان دسترسی به رطوبت کمتر شده، رشد گیاه بیش از فتوسنتز محدود می‌شود و تنفس رشد کاهش می‌یابد در نتیجه بخش بیشتری از مواد فتوسنتزی به تولید اسانس اختصاص می‌یابد. زمانی که دسترسی به منابع بسیار اندک باشد (تنش شدید خشکی) ممکن است فتوسنتز آن قدر کاهش یابد که عمده کربن تثبیت شده از طریق تنفس مصرف گردد، در نتیجه رشد و حتی تولید متابولیت‌های ثانویه هم کاهش یابد که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد (Herms and Mattson, 1992).



شکل ۵- مقایسه میانگین آثار متقابل تنش خشکی و میزان سایکوسل بر درصد اسانس در گیاه رازیانه. ستون‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

نتیجه‌گیری

سرعت فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، سرعت تعرق، محتوای آب نسبی، افزایش غلظت CO_2 اتاقک زیرروزنه‌ای و دمای کانوی در رازیانه شد. اما

تنش خشکی، تبادلات گازی گیاه را تحت تأثیر قرار داده، سبب کاهش اغلب صفات فیزیولوژیک نظیر:

خواهد بود.

سپاسگزاری

نگارندگان از زحمات آقایان دکتر افشین توکلی، دکتر مجید پوریوسف و مهندس اسماعیل زنگانی به خاطر مشاوره و راهنمایی کمال تشکر را می‌نمایند.

سایکوسل توانست با افزایش معنی دار فتوسنتز و هدایت مزوفیلی و کاهش هدایت روزنه ای و سرعت تعرق، تا حدی آثار منفی تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیک گیاه را کاهش دهد. بنابراین، به نظر می‌رسد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مانند سایکوسل به منظور به دست آوردن متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی مفید

منابع

- Ahmadian Chashmi, N., Sharifi, M., Karimi, F. and Rahnama, H. (2011) Comparative study of tropane alkaloids production in hairy roots and plantlet cultures of *Atropa belladonna* L. by salicylic acid treatments. *Iranian Journal of Plant Biology* 3: 63-76.
- Andalibi, B. (2009) Changes of essential oil and its composition in Iranian dill (*Anethum graveolens* L.) during growth and development under limited irrigation conditions. PhD thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran (in Persian).
- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51(2): 163-190.
- Ashraf, M., Karim, F. and Rasul, E. (2002) Interactive effects of gibberlic acid and salt stress on growth, ion accumulation and photosynthetic capacity of two-spring wheat cultivars differing in salt tolerance. *Plant Growth Regulation* 36: 49-59.
- Chai, Y., Zhang, S. and Yao, C. (2011) Effect of drought stress and rewatering on photosynthetic physiological characteristics of sorghum. In: *Proceeding of International Conference Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE)* Nanjing, China.
- Chinnusamy, V. (2004) Use of genetic engineering and molecular biology approaches for crop improvement for stress environments. In: *Abiotic stress: plant resistance through breeding and molecular approaches* (Eds. Xiong, L. and Zhu, J. K.) 47-107. Taylor and Francis Press, New York.
- Cornic, G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture- not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187-198.
- Ellabban, H. M. (1978) Effect of cycocel and spacings on the growth and volatile oil of *Cymbopogon citratus*. *Scientia Horticulturae* 8: 237-242.
- Emam, Y. and Moaid, G. R. (2000) Effect of planting density and chlormequat chloride on morphological and physiological characteristics of winter parley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar "Valfajr". *Journal of Agricultural Science and Technology (JAST)* 2: 75-83.
- Erdem, Y., Shirali, S., Erdem, T. and Kenar, D. (2006) Determination of crop water stress index for irrigation scheduling of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30: 195-202.
- Geoffrey, J. D. (2011) Modifying poppy growth and alkaloid yield with plant growth regulator. MSc thesis, University of Tasmania, Hobart, Australia.
- Hashemi, S., Asrar, Z. and Pourseyedi, S. (2010) Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some physiological and biochemical parameters in *Lepidium sativum*. *Iranian Journal of Plant*

- Biology 4: 1-10.
- Hermes, D. A. and Mattson, W. J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology, Chicago Journals* 67(3): 283-325.
- Hirayama, M., Wada, Y. and Nemoto, H. (2006) Estimation of drought tolerance based on leaf temperature in upland rice breeding. *Breeding Science* 56: 47-54.
- Jaana, L., Rikala, R. and Aphalo, P. J. (2002) Effect of CCC and daminnozide on growth of silver birch container seedlings during three years after spraying. *New Forests* 23: 71-80.
- Ma, B. L. and Smith, D. L. (1992) Modification of tiller productivity in spring barley by application of chlormequat or ethephon. *Crop Science* 32: 735-740.
- Ma, Q. Q., Wang, W. Y., Li, H., Li, D. Q. and Zou, Q. (2006) Alleviation of photoinhibition in drought stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar applied glycinebetaine. *Journal of Plant Physiology* 163: 165-175.
- Mamnoei, E. and Seyed Sharifi, R. (2010) Study the effects of water deficit on chlorophyll fluorescence indices and the amount of proline in six barley genotypes and its relation with canopy temperature and yield. *Iranian Journal of Plant Biology* 5: 51-62.
- Merah, O. (2001) Potential importance of water status traits for durum wheat improvement under Mediterranean conditions. *Journal of Agricultural Research* 137: 139-145.
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J. and Wang, X. (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in arabidopsis. *Science* 312: 264-266.
- Nejadsahebi, M., Moallemi, N. and Landi, A. (2010) Effect of cycocel and irrigation regimes on some physiological parameters of three olive cultivars. *American Journal of Applied Sciences* 7(4): 459-465.
- Omea, H., Kumar, A., Kashiwaba, K. and Shon, M. (2007) Assessing drought tolerance of snap bean (*Phaseolus vulgaris*) from genotype difference in leaf water relation, shoot growth and photosynthetic parameters. *Plant Production Science* 10(1): 8-35.
- Parida, A. K. and Das, A. B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60(3): 324-349.
- Patel, N. R., Mehta, A. N. and Shekh, A. M. (2001) Canopy temperature and water stress quantification in rain fed pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Mill. sp.). *Agricultural and Forest Meteorology* 109: 223-232.
- Rabbi Angourani, H., Mortazavi, A. N., Rabiei, V. and Zangani, E. (2013) Effect of cycosel and nafthalene acetic acid on some vegetative characteristics and on essential oil yield in Rose-scented Geranium (*Pelargonium graveolens* L.cv. Bourbon). *Iranian Journal of Horticultural Science* 44(2): 209-216 (in Persian).
- Rajala, A. (2003) Plant growth regulators to manipulate cereal growth in northern growing conditions. PhD thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Ramachandra Reddy, A., Choityana, K. V. and Ivekanadan, R. (2004) Drought induced response of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plant. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- Saei, A., Zamani, Z., Talaie, A. and Fatahi, R. (2006) Influence of drought stress periods on olive (*Olea europaea* L. cv. Zard) leaves stomata. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 430-433.
- Safikhani, F., Heydari sharifabad, H., Syadat, A., Sharifi ashorabadi, A., Syednedjad, M. and Abbaszadeh, B. (2007) The effect of drought stress on percentage and yield of essential oil and physiological characteristics of *Deracocephalum moldavica* L.. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*

- 23(1): 86-99 (in Persian).
- Saglam, A., Kadioglu, A., Terzi, R. and Saruhan, N. (2008) Physiological changes in them in post stress emerging *Ctenanthe setosa* plant under drought condition. Russian Journal of Plant Physiology 55(1): 48-53.
- Shah, S. H. (2011) Growth and photosynthetic characteristics of *Nigella sativa* L. as affected by presowing seed treatment with kinetin. Photosynthetica 49(11): 154-160.
- Sherif, S., Safferi, M. and Emam, Y. (2007) The effect of drought stress and cycocel on barley yield (cv. Valfajr). Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resource, Water and Soil Science 10(4): 281-291.
- Siddique, M. R., Hamid, B. A. and Islam, M. S. (2000) Drought stress effects on water relation of wheat. Botanical Bulletin of Academia Sinica 41: 35-39.
- Siosemardeh, A., Ahmadi, A. and Poustini, K. (2005) Stomatal and nonstomatal factors controlling photosynthesis and its relation to drought resistance in wheat cultivars. Iranian Journal of Agricultural Science 35: 93-106 (in Persian).
- Smirnov, O., Kosyan, A. and Kosyk, O. (2012) The cycocel effect on flavonoids content and phenyl alanine ammonia-lase (PAL) activity in buckwheat plant. Studia Biologica 6(3): 247-252.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002) Plant physiology. 3rd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Yamori, M., Hikosaka, K. and Way, D. A. (2013) Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. Photosynthesis Research 13(98): 74-76.

مطالعه واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چمن *Agrostis stolonifera* و *Festuca arundinacea* Schreb. نسبت به تنش خشکی

ایوب ملاحمد نالوسی^۱، عبدالله حاتم‌زاده^۱، محمود قاسم‌نژاد^{۱*} و محمدحسن علی بیگلویی^۲

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ گروه مهندسی آب، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدود کننده رشد چمن‌ها در مناطق خشک و نیمه خشک است. در پژوهش حاضر، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دو گونه چمن، *Agrostis stolonifera* var. *palustris* و *Festuca arundinacea* Schreb. var. *ky 31* طی یک دوره ۴۰ روزه تنش خشکی (نیروی مکش ۷۰-۷۵ سانتی‌بار خاک) با فواصل زمانی ۱۰ روز یک بار و همچنین مرحله رشد مجدد در پایان دوره تنش ارزیابی گردید. گیاهان شاهد در مدت اعمال تنش خشکی به طور منظم در حد ظرفیت زراعی خاک (نیروی مکش ۲۰-۲۵ سانتی‌بار خاک) آبیاری شدند. نتایج نشان داد که با طولانی شدن مدت تنش، محتوای نسبی آب برگ و میزان کلروفیل برگ به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میزان نشت یونی و غلظت پرولین برگ طی تنش خشکی به طور معنی‌داری افزایش یافت و در زمان آبیاری مجدد در پایان دوره تنش خشکی به سطح شاهد رسید. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز برگ تا ۳۰ روز پس از آغاز تنش خشکی در گونه‌های *F. arundinacea* Schreb. و *A. stolonifera* افزایش و پس از آن کاهش یافت. در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تا ۲۰ روز پس از آغاز تنش افزایش و سپس کاهش نشان داد. همچنین در گونه *A. stolonifera* Schreb. فعالیت آنزیم کاتالاز در طول تنش افزایش و در زمان رشد مجدد کاهش یافت. در گونه *A. stolonifera* طی تنش خشکی و رشد مجدد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. در مجموع، نتایج نشان داد که گونه مقاوم *F. arundinacea* Schreb. تحت شرایط تنش خشکی دارای نشت یونی کمتر، محتوای نسبی آب برگ بیشتر و تخریب کلروفیل کمتری در مقایسه با گونه حساس *A. stolonifera* بوده است.

واژه‌های کلیدی: *Agrostis stolonifera*، *Festuca arundinacea* Schreb.، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش خشکی،

پرولین

مقدمه

در مناطقی که تأمین آب برای فضای سبز روز به روز مشکل‌تر می‌شود، تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عامل محیطی محدود کننده رشد در علفی‌های چمنی است (Salahvarzy *et al.*, 2008). در حدود یک سوم اراضی جهان با کمبود بارندگی مواجه است و ایران با متوسط بارندگی ۲۵۰ میلی‌متر در سال جزو مناطق خشک جهان طبقه‌بندی شده است و از این قاعده مستثنی نیست. عدم بارندگی کافی و توزیع غیریکنواخت آن در طول دوره رشد در مناطق خشک و نیمه خشکی نظیر ایران باعث شده است که نیاز آبی چمن‌ها به قدر کافی تأمین نشود. با توجه به این که قرار گرفتن این گیاهان در معرض تنش خشکی به ویژه در برخی از ماه‌های سال امری اجتناب‌ناپذیر است، بنابراین برای رشد و کیفیت مناسب باید کمبود آب از طریق آبیاری جبران شود. همچنین با توجه به این که خشکی از ویژگی‌های بارز کشور است و راه فراری از این پدیده طبیعی و غیرقابل تغییر وجود ندارد و از سوی دیگر، مصرف منابع انرژی، آب و مواد غذایی به طور روزافزونی در جامعه در حال افزایش است، بنابراین اتخاذ روش‌هایی همچون بهره‌برداری صحیح از آب به همراه استفاده از شیوه‌های صحیح شامل کشت گیاهان مقاوم، شناخت ارتباط کمبود آب خاک و رشد گیاهان در هر مرحله و بررسی واکنش‌های فیزیولوژیک در مقابله با تنش، مفید خواهد بود (Kocheiki and Nasiri, 1994; Mahalati, 1994).

در ایران، تأثیر تنش خشکی بر اغلب محصولات زراعی به طور مفصل بررسی شده است، اما متأسفانه در مورد چمن‌ها کمتر پژوهش‌های همه‌جانبه انجام شده

است، در صورتی که تغییرهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی زیادی در هنگام تنش خشکی در گونه‌های مختلف چمن‌ها دیده می‌شود. به طور معمول، ارزیابی عکس‌العمل چمن‌ها به کمی رطوبت خاک بدون توجه به عکس‌العمل‌های فیزیولوژیک آنها انجام می‌گیرد. در این زمینه، از محتوای نسبی آب برگ (RWC) به عنوان شاخصی مناسب از وضعیت آب برگ‌ها یاد می‌شود که در صورت پیشرفت تنش خشکی کاهش می‌یابد و سبب تغییرهایی در غشای یاخته‌ای می‌شود (Fu *et al.*, 2004). گیاهان با استفاده از سازوکارهای متفاوت، در شرایط خشکی فشار تورژسانس سلول‌های خود را بالا نگه می‌دارند تا رشد آنها متوقف نشود. از جمله سازوکارهای کارآمد برای حفظ فشار تورژسانس در شرایط تنش خشکی تنظیم اسمزی است (Morgan, 1984). سال‌هاست که فیزیولوژیست‌ها تجمع پرولین آزاد در گونه‌های متعدد گیاهی در پاسخ به تنش اسمزی را مطالعه می‌کنند (Hare *et al.*, 1999). پرولین آزاد و پیوندی به پروتئین‌ها از اجزای ضروری سلول‌های گیاهی هستند. میزان پرولین آزاد در بسیاری از گیاهان در پاسخ به پتانسیل پایین آب (نظیر خشکی و شوری) به مقدار زیاد تجمع می‌یابد (Ranney *et al.*, 1991; Kuznetsov and Shevyakova, 1999). پرولین علاوه بر اسمولیت بودن، به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی نیز قابل بررسی است، بنابراین می‌توان پرولین را یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی برای دفع آثار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به شمار آورد (Gill and Tuteja, 2010).

در شرایط تنش، عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و توانایی گیاه برای سمیت‌زدایی این گونه‌ها

۳۷ درجه و ۲۵ دقیقه شمالی) انجام شد. برای این منظور دو گونه چمن اگروستیس (*Agrostis stolonifera* var. *palustris*) و فستوکا (*Festuca arundinacea*) Schreb. var *ky 31*) در مخلوط خاکی با نسبت حجمی ۱:۱:۲ از خاک با بافت لومی، ماسه، کود دامی و پیت ماس در گلدان‌هایی با قطر متوسط ۲۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر کشت شدند. پس از رشد و استقرار گیاهان طی ۱۳ هفته، گیاهان جهت اعمال تنش خشکی در سطوح مختلف رطوبتی خاک، شامل آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی (نیروی مکش ۲۰-۲۵ سانتی‌بار) و تنش خشکی (نیروی مکش ۷۰-۷۵ سانتی‌بار) قرار گرفتند (Alizadeh, 2004). نیروی مکش خاک در سطوح مختلف رطوبتی با استفاده از دستگاه تانسومتر (مدل ARL Series Model ۲۷۲۵، شرکت Soilmoisture، آمریکا) که در هر گلدان کار گذاشته شده بود، اندازه‌گیری شد. در هر نوبت آبیاری خاک تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شد. در مدت انجام این آزمایش میانگین دمای شب و روز گلخانه به ترتیب در حدود ۱۴ و ۲۳ درجه سانتیگراد تنظیم شد. صفات فیزیولوژیک شامل: محتوای نسبی آب برگ (RWC)، نشت یونی (EL)، محتوای کلروفیل، میزان پروکلین و فعالیت آنزیمی SOD، POD، APX و CAT در هر مرحله از نمونه‌برداری اندازه‌گیری شد. نخستین نمونه برداری برگی برای ارزیابی صفات، پیش از اعمال تیمار تنش خشکی و نمونه‌برداری‌های بعدی در دوره‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روزه پس از آغاز تنش خشکی صورت گرفت. پس از پایان تنش خشکی به منظور بررسی رشد مجدد، ۱۸ روز پس از آبیاری دوباره، آخرین نمونه‌برداری انجام گرفت.

باعث آسیب به گیاه شده و تنش اکسیداتیو را به دنبال دارد (Arghavani et al., 2010). برای سمیت‌زدایی، مجموعه‌ای از سیستم‌ها در گیاه وارد عمل می‌شوند که از جمله آنها می‌توان به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی نظیر: سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد (Dabrowska et al., 2007). Xu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در چمن‌های کنتاکی بلوگراس (*Poa pratensis*) و تال فسکیو (*Festuca arundinacea*) طی تنش به طور معنی‌داری برای کاهش تأثیرات تنش افزایش یافت. ارتباط بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بالا رفتن مقاومت در چندین گونه گیاهی تأیید شده است. اگرچه، اثر تنش خشکی بر رشد و عملکرد گیاهان مختلف در سال‌های گذشته مطالعه شده است، اما تحقیقات اندکی در مورد آثار تنش خشکی روی چمن انجام شده است. مدیریت مناسب و درک پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چمن در شرایط تنش خشکی نقش مهمی در به حداقل رساندن مشکلات چمن‌کاری در نواحی خشک و نیمه خشک دارد. بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر شناسایی سازوکار مقاومت و میزان تحمل دو گونه چمن و همچنین پیدا کردن زمان بحرانی آبیاری طی تنش است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان (با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی

سانتریفیوژ (مدل 5417R، شرکت Eppendorf، آلمان) شد و در نهایت، عصاره استونی شفاف جدا شد و پس از تاریکی، میزان کلروفیل با روش اسپکتروفتومتری در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین مقدار کلروفیل‌های a و b و کلروفیل کل از رابطه‌های ۳، ۴ و ۵ استفاده شد (Arnon, 1949).

$$\text{Ch}_a = (19.3 \times A_{663} - 0.86 A_{645}) V / 100W \quad \text{رابطه ۳:}$$

$$\text{Ch}_b = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V / 100W \quad \text{رابطه ۴:}$$

$$\text{Ch}_T = \text{Ch}_a + \text{Ch}_b \quad \text{رابطه ۵:}$$

غلظت پرولین: برای اندازه‌گیری غلظت پرولین، ۰/۵ گرم بافت برگ چمن با نیتروژن مایع درون هاون آسیاب شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۱۰ درصد اضافه گردید. این مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شد. سپس به ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف شده ۲ میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین (حاوی ۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید و ۳۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار) و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید اضافه گردید و پس از آن به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. واکنش با فرو بردن در یخ متوقف شد. سپس، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه و به مدت ۱۵-۲۰ ثانیه ورتکس شد. جذب نوری محلول قرمز رنگ فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل Itd T80+UV/VIS; PG، شرکت Leicestershire Instruments Model، انگلستان) خوانده گردید. غلظت پرولین نمونه‌ها از روی منحنی جذب غلظت‌های پرولین محلول‌های استاندارد با رابطه ۶ محاسبه شد (Bates et al., 1973).

رابطه ۶:

نشت یونی (EL): برای تعیین EL، از هر گلدان ۹ عدد برگ تازه نمونه‌برداری شد و در لوله‌های آزمایشگاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر قرار داده شد. درب لوله‌ها با سرپوش پلاستیکی بسته و در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۱۲ ساعت، هدایت الکتریکی اولیه محیط (EC_1) با دستگاه EC سنج (مدل MI306، شرکت Milwaukee WI، آمریکا) اندازه‌گیری شد. پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شدند تا به طور کامل بافت‌ها کشته شوند و همه الکترولیت‌ها آزاد شود. سپس، نمونه‌ها تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خشک شد و هدایت الکتریکی ثانویه (EC_2) اندازه‌گیری شد و EL از رابطه ۱ محاسبه شد (Shaoyun et al., 2009).

$$\text{EL} = (EC_1 / EC_2) \times 100 \quad \text{رابطه ۱:}$$

محتوای نسبی آب برگ (RWC): برای تعیین محتوای نسبی آب برگ در ابتدا ۰/۵ گرم برگ تازه (Wf) توزین و به مدت چهار ساعت در آب مقطر قرار داده شد، پس از این مدت مجدداً توزین شد (Ws) و در پایان، درون پاکت‌های کاغذی قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتیگراد نگه داشته شد تا کاملاً خشک شود (Wd). در نهایت، محتوای نسبی آب برگ از رابطه ۲ محاسبه شد (Shaoyun et al., 2009).

$$\text{RWC} = [(Wf - Wd) / (Ws - Wd)] \times 100 \quad \text{رابطه ۲:}$$

میزان کلروفیل: برای اندازه‌گیری کلروفیل، مقدار ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ آسیاب شده گیاه با یک میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. مخلوط به دست آمده، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه

بیان شد (Giannopolitis and Ries, 1977). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از طریق اندازه‌گیری اکسید شدن آسکوربات با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای مدت زمان یک دقیقه انجام شد. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی $2/\lambda \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر در یک دقیقه بیان شد (Nakano and Asada, 1981).

فعالیت آنزیم کاتالاز از طریق اندازه‌گیری تجزیه آب اکسیژنه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای مدت زمان یک دقیقه انجام گرفت و فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی $40 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر در یک دقیقه بیان شد (Chance and Maehly, 1955).

تحلیل داده‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل شامل: دو گونه چمن، تنش خشکی و زمان در ۴ تکرار اجرا شد. تحلیل آماری داده‌های حاصل از صفات اندازه‌گیری توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی نتایج نشان داد که در شرایط تنش خشکی، میزان نشت یونی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، با افزایش مدت تنش میزان نشت یونی به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت، همچنین بیشترین میزان

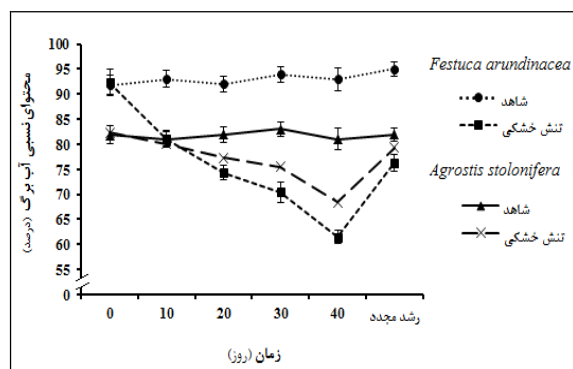
[۵/گرم نمونه]/[میکرومول/میکروگرم ۱۱۵/۵/ (میلی لیتر تولوئن × میلی لیتر/میکروگرم پرولین)]=
($\mu\text{mol/gFw}$) پرولین

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: برگ‌های تازه از چمن در هاون چینی ریخته و به آن نیتروژن مایع اضافه شد. ۰/۵ گرم از برگ آسیاب شده با افزودن ۱ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (اسیدیته=۷) حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVPP) ۲ درصد و EDTA ۰/۱ میلی مولار به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام عمل سانتریفیوژ مایع رویی برداشته شد. از مایع رویی برای سنجش آنزیم‌های APX، SOD، POD و CAT استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم POD با استفاده از آب اکسیژنه ۴۵ میلی مولار و گایاکول ۲۲۵ میلی مولار و بافر فسفات و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی محاسبه شد و میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز $26/6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و در پایان، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر در یک دقیقه بیان شد (Chance and Maehly, 1955).

سنجش فعالیت آنزیم SOD در مخلوط واکنش به حجم ۱/۵ میلی لیتر و حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (اسیدیته=۷)، EDTA ۰/۱ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، NBT، ریوفلاوین و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیم انجام گردید. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر

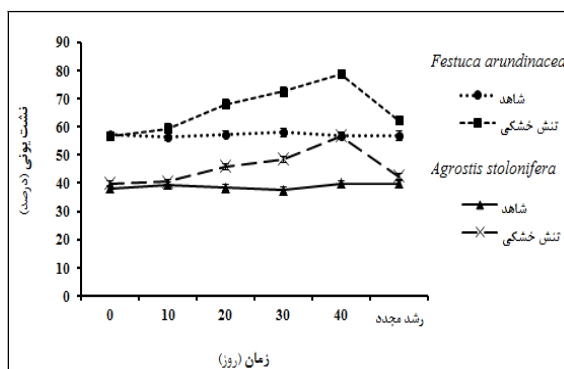
تنش بیشترین کاهش در محتوای نسبی آب برگ در دو گونه چمن مشاهده شد. همچنین، پس از آبیاری دوباره، چمن‌ها توانستند محتوای نسبی آب برگ خود را به سطح شاهد برسانند (شکل ۲). Naloussi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که رشد مجدد پس از تیمار تنش خشکی با توانایی هر چه بیشتر در جذب آب در اثر آبیاری پس از یک دوره خشکی در دو گونه چمن *A. stolonifera* و *F. arundinacea* Schreb. همبستگی دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های برگ پس از اعمال تنش خشکی، همچنان ظرفیت خود را در جذب آب و ایجاد آماس حفظ می‌کنند. همبستگی منفی و معنی‌داری بین محتوای نسبی آب برگ و تنش خشکی طی تنش خشکی به دست آمد و این موضوع نشانگر آن است که کاهش محتوای نسبی آب برگ به آسیب‌پذیری بیشتر غشا و در نتیجه آزاد شدن الکترولیت‌های بیشتر طی تنش خشکی منجر می‌شود (جدول ۱).



شکل ۲- مقایسه تغییرات محتوای نسبی آب برگ طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.

گیاهان تنش دیده نسبت به شاهد افزایش یافت، همچنین بیشترین میزان تخریب کلروفیل در ۴۰ روز پس از آغاز تنش مشاهده شد (شکل ۳). کاهش میزان

نشست یونی در ۴۰ روز پس از آغاز تنش مشاهده شد. میزان نشست یونی در گونه *A. stolonifera* بیشتر از گونه *F. arundinacea* Schreb. بود (شکل ۱). گزارش‌های پیشین نیز نشان داده است که بیشترین میزان نشست یونی غشا سلول برگی در تنش طولانی مدت و در پایین‌ترین سطح آبیاری خاک اتفاق می‌افتد (Inze and Van Montagu, 1995). آبیاری مجدد باعث شد که میزان نشست یونی در دو گونه چمن به سطح اولیه شاهد برسد. Wang و Huang (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که پایداری غشای سلول‌ها در چمن کنتاکی بلوگراس پس از رفع تنش، دوباره به حالت اولیه باز می‌گردد. از آنجا که نشست یونی در اثر تخریب غشا و خروج یون‌ها اتفاق می‌افتد، بنابراین برای رشد دوباره چمن‌ها بازسازی غشا و کاهش نشست یونی ضروری است. نتایج نشان داد که محتوای نسبی آب برگ چمن‌ها در شرایط تنش خشکی کاهش پیدا کرد. با افزایش مدت تنش این کاهش بیشتر بود و ۴۰ روز پس از آغاز



شکل ۱- مقایسه تغییرات نشست یونی طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.

نتایج نشان داد که در شرایط تنش خشکی میزان کلروفیل برگ به طور معنی‌داری کاهش یافت، با طولانی شدن مدت تنش میزان تخریب کلروفیل در

یافت، با افزایش مدت تنش میزان پرولین در گیاهان تنش دیده نسبت به شاهد افزایش یافت، همچنین بیشترین میزان پرولین در ۴۰ روز پس از آغاز تنش مشاهده شد (شکل ۴). پرولین به عنوان یک محافظ در برابر تنش عمل می‌کند؛ بدین ترتیب که به طور مستقیم یا غیرمستقیم با درشت مولکول‌ها اثر متقابل دارد و از این طریق به حفظ شکل و ساختار طبیعی آنها تحت شرایط تنش کمک می‌کند. یکی از ویژگی‌های فیزیکی پرولین حلالیت بالای آن است (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). همزمان با بهبود وضعیت آبی برگ‌ها و پس از رشد مجدد، گونه *A. stolonifera* توانست، با کاهش سریعتر محتوای پرولین خود تا سطح شاهد نسبت به *F. arundinacea* Schreb.، زمینه را برای رشد و نمو دوباره فراهم نماید. مطابق با همین نتایج، Salahvarzy و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که میزان پرولین پس از رشد مجدد پس از تنش خشکی کاهش می‌یابد. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین نشت یونی و پرولین طی تنش خشکی برای گونه *F. arundinacea* Schreb. ($R=0/95$) و گونه *A. stolonifera* ($R=0/98$) به دست آمد و این موضوع نشان دهنده آن است که با شدت تنش و افزایش آسیب غشا، میزان پرولین تولید شده توسط گیاه برای حفظ فشار اسمزی افزایش می‌یابد (جدول ۱).

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های POD و SOD برگ تا ۳۰ روز پس از آغاز تنش خشکی در هر دو گونه چمن افزایش و سپس کاهش یافت. در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت آنزیم APX تا ۲۰ روز پس از آغاز تنش افزایش و سپس کاهش نشان داد.

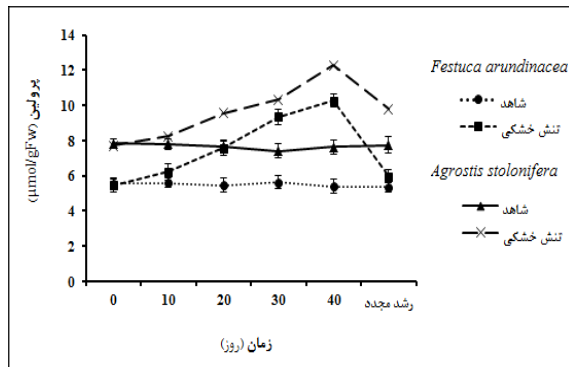
کلروفیل در اثر تنش خشکی می‌تواند به علت کاهش سنتز یا افزایش تجزیه آن باشد. Santos (۲۰۰۴) گزارش کرده است که در روزهای نخست پس از تنش، فعالیت آنزیم کلروفیلاز که سبب تجزیه کلروفیل می‌شود، افزایش می‌یابد، اما با گذشت زمان، کاهش سنتز کلروفیل علت اصلی کاهش میزان کلروفیل است. در واقع، خشک شدن بافت‌های برگ نه تنها موجب تخریب کلروفیل می‌شود، بلکه مانع ساخته شدن آن نیز می‌شود. در شرایط کمبود آب، غلظت آمینو اسید پرولین افزایش می‌یابد، از آنجا که کلروفیل و پرولین هر دو از پیش ماده مشترکی به نام گلوتامات (Glutamate) سنتز می‌شوند، می‌توان گفت افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش خشکی به کاهش سنتز کلروفیل می‌انجامد (Aspinall and Paleg, 1981).

همچنین Egert و Tevini (۲۰۰۲) اظهار داشتند که کاهش کلروفیل در گیاهان تحت تنش خشکی، از علامت‌های مشخص تنش اکسیداتیو است. میزان کلروفیل پس از آبیاری دوباره در مقایسه با زمان تنش افزایش یافت اما به سطح شاهد نرسید. همچنین Wang و Huang (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که میزان کلروفیل پس از رشد مجدد نسبت به زمان تنش در کنتاکی بلوگراس به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همبستگی منفی و معنی‌داری بین نشت یونی و کلروفیل کل طی تنش خشکی به دست آمد که این روند نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش، میزان تخریب کلروفیل افزایش می‌یابد (جدول ۱).

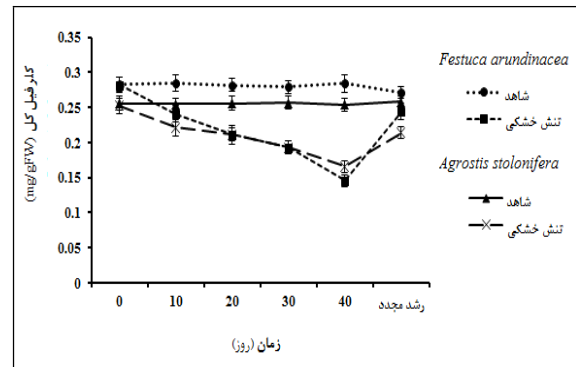
نتایج نشان داد که در شرایط تنش خشکی میزان پرولین در هر دو گونه چمن به طور معنی‌داری افزایش

رشد مجدد فعالیت آنزیم APX و CAT به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل‌های ۵، ۶، ۷، ۸).

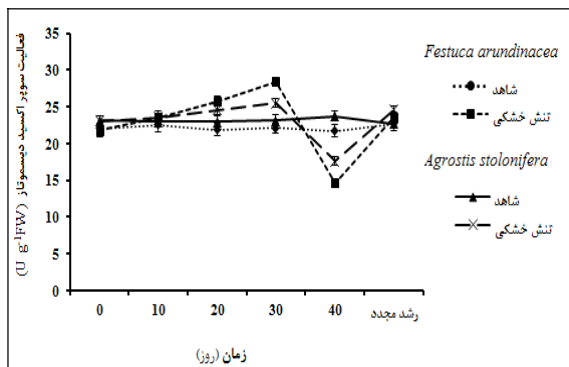
همچنین در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت CAT طی تنش افزایش و در زمان رشد مجدد کاهش یافت. در گونه *A. stolonifera* طی تنش خشکی و



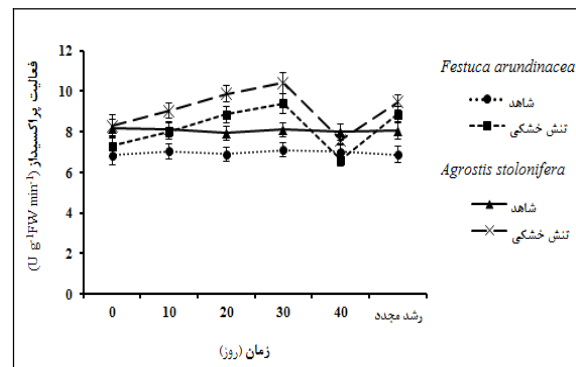
شکل ۴- مقایسه تغییرات پرولین طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



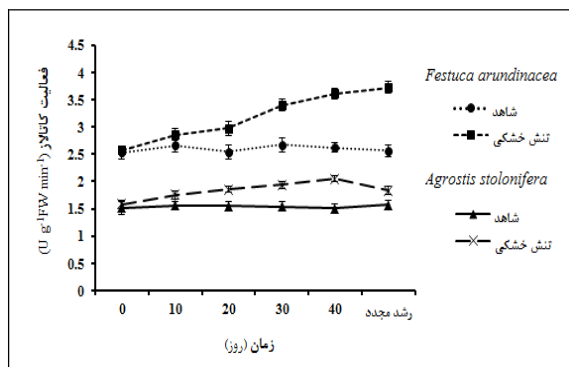
شکل ۳- مقایسه تغییرات کلروفیل کل طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



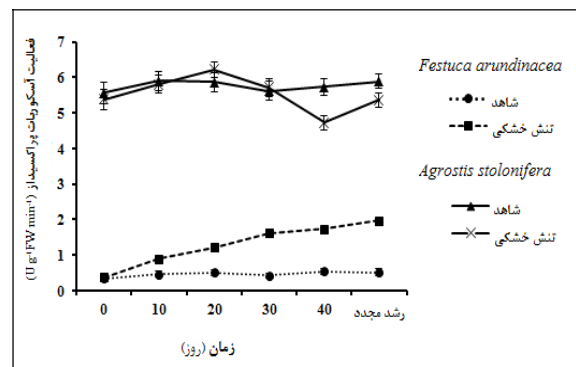
شکل ۶- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم SOD طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



شکل ۵- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم POD طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



شکل ۸- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم CAT طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



شکل ۷- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم APX طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.

جدول ۱- ضریب همبستگی پیرسون بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده در دو گونه چمن. **، * به ترتیب همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	پرویلین	کلروفیل کل	محتوای نسبی آب برگ	نشت یونی	شاخص‌های اندازه‌گیری شده	
							۱	نشت یونی	
						۱	** -۰/۹۸۹	محتوای نسبی آب برگ	
					۱	** ۰/۹۵۸	** -۰/۹۳۱	کلروفیل کل	
				۱	** -۰/۹۶۰	** -۰/۹۵۷	** ۰/۹۵۴	پرویلین	<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.
			۱	۰/۱۶۵	۰/۰۷۶	۰/۲۹۳	-۰/۲۶۱	پراکسیداز	
			*	۰/۸۸۹	۰/۵۱۴	۰/۶۹۴	-۰/۶۵۹	سوپراکسید دیسموتاز	
	۱	۰/۸۰۳	۰/۷۷۶	-۰/۵۲۳	۰/۳۹۶	۰/۵۲۲	-۰/۵۰۵	آسکوربات پراکسیداز	
۱	۰/۳۰۵	-۰/۴۰۷	۰/۰۴۴	** ۰/۹۵۶	** -۰/۹۸۹	** -۰/۹۲۴	** ۰/۹۰۵	کاتالاز	
							۱	نشت یونی	
						۱	** -۰/۹۵۸	محتوای نسبی آب برگ	
					۱	** ۰/۹۹۷۴	** -۰/۹۷۳	کلروفیل کل	
				۱	** -۰/۹۵۷	** -۰/۹۸۹	** ۰/۹۸۹	پرویلین	<i>Agrostis stolonifera</i>
			۱	-۰/۰۸۸	۰/۰۵۴	۰/۱۶۵	-۰/۱۰۶	پراکسیداز	
			*	۰/۹۶۳	۰/۲۸۴	۰/۳۵۸	-۰/۳۰۹	سوپراکسید دیسموتاز	
	۱	۰/۵۶۴	۰/۷۴۰	۰/۵۰۶	-۰/۵۶۵	-۰/۴۴۷	۰/۵۱۵	آسکوربات پراکسیداز	
۱	۰/۸۶۵	۰/۴۱۹	۰/۵۴۶	۰/۷۳۱	-۰/۶۵۴	-۰/۶۴۴	* ۰/۶۹۶	کاتالاز	

پاکسازی ROS های تولید شده در آپوپلاست است (Zhang, 2003). بنابراین، آنزیم‌های SOD، POD، CAT و APX می‌توانند یک سیستم دفاعی برای مقابله با تخریب اکسیداتیو باشند. کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD ۳۰ روز پس از تنش خشکی در گونه‌های *A. stolonifera* و *F. arundinacea* Schreb. نشان‌دهنده آن است گیاه تا حدی قادر به افزایش فعالیت آنزیم‌های خاص است و زمانی که میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) بیش از فعالیت آنتی‌اکسیداتیوی گیاه باشد، دیگر گیاه توانایی تحمل تنش را نخواهد داشت. پس از آبیاری دوباره در چمن‌های *A. stolonifera* و *F. arundinacea* Schreb. فعالیت آنزیم‌های SOD و POD در گیاهان تحت تنش خشکی نسبت به شاهد دوباره افزایش یافت که نشان‌دهنده آن است که هنوز در گیاه عوامل سمیت زایی وجود دارد که گیاه برای از بین

آنزیم SOD نخستین سد دفاعی در مقابل ROS و پالاینده اصلی رادیکال سوپراکسید است (Shehab et al., 2010). این آنزیم نقش کلیدی در تنظیم غلظت رادیکال سوپراکسید و پراکسید دارد (Diego et al., 2003). Shehab و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT، APX، SOD) برای حفاظت از گیاه در مقابل تنش خشکی صورت می‌گیرد. آنزیم POD نقش کلیدی در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن و حذف مالون‌دی‌آلدئید که باعث پراکسیداسیون غشا می‌شود و در حفظ و ثبات و پایداری دیواره سلولی نقش دارد (Hojati et al., 2011). Xu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX در چمن‌های کنتاکی بلوگراس و تال فسکیو طی تنش شوری به طور معنی‌داری در راستای کاهش آثار تنش افزایش یافت. همچنین بیان شده است که APX یکی از عوامل مهم

افزایش نشت یونی، میزان فعالیت این آنزیم برای کاهش سمیت ROSهای تولید شده افزایش می‌یابد. مشابه با پژوهش‌های دیگر (Anderson et al., 1995) بررسی فعالیت آنزیمی در پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم‌های مختلف بر اساس یک الگو در هنگام تنش خشکی و آبیاری مجدد تغییر نمی‌کند. پاسخ آنتی‌اکسیدان‌ها به کمبود آب، به شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. گونه‌های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش کم آبی دارند که می‌تواند از طریق بالا بردن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش پیدا کند (Hosseini Boldaji et al., 2012).

جمع‌بندی

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که گونه مقاوم به خشکی *F. arundinacea* Schreb. تحت شرایط تنش خشکی دارای نشت یونی کمتر، محتوای نسبی آب برگ بیشتر و تخریب کلروفیل کمتری بود، با توجه به این که گونه حساس به خشکی *A. stolonifera* دارای نشت یونی و تخریب کلروفیل بیشتر و محتوای نسبی آب برگ کمتر در مقایسه با *F. arundinacea* Schreb. بود می‌توان بیان کرد که این گونه تا زمانی می‌تواند خشکی را تحمل کند که میزان محتوای نسبی آب برگ از ۷۰ درصد کمتر و میزان نشت یونی از ۷۴ درصد بیشتر نشود که باعث از بین رفتن سلول‌های گیاه شود. همچنین، مشخص شد که تا ۳۰ روز پس از تنش کارکردهای فیزیولوژیک این گونه به خوبی ادامه پیدا کرد، اما پس از ۳۰ روز با

بردن آنها مجبور به افزایش فعالیت برخی آنزیم‌ها است. Bian و Jiang (۲۰۰۹) در بررسی خود روی چمن کنتاکی بلوگراس گزارش کردند میزان بیان ژن POD پس از رشد مجدد در گیاهان تنش دیده بالا رفته و به همین دلیل میزان فعالیت آنزیم به طور معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش یافته است.

بنا بر گزارش Kavitha و همکاران (۲۰۰۸) تنش اکسیداتیو موجب افزایش در سطح بیان آنزیم APX در برگ‌های *Avicennia marina* می‌شود. آنها همچنین بیان نمودند که فعالیت APX در برگ‌های این گونه نقش مهمی در کاستن آثار زیان‌بار تنش اکسیداتیو دارد. نقش APX در حذف ROS از سلول‌های گیاه *Euphorbia esula* L. در مواجهه با تنش‌های محیطی نظیر: شوری، خشکی و سمیت عناصر نیز توسط Davis و Swanson (۲۰۰۱) گزارش شده است. در پژوهش حاضر، میزان فعالیت آنزیم APX طی تنش خشکی و همچنین طی رشد مجدد پس از تنش در گونه *A. stolonifera* در مقایسه با شاهد به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۷). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، Bian و Jiang (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت آنزیم APX در زمان رشد مجدد پس از تنش خشکی روی چمن کنتاکی بلوگراس افزایش یافت. عکس‌العمل‌های متفاوت این آنزیم در زمان رشد مجدد پس از تنش به گونه گیاهی، شدت تنش و میزان ROSهای تولید شده وابسته است.

در پژوهش حاضر، همبستگی مثبت و معنی داری بین نشت یونی و آنزیم CAT در هر دو گونه چمن طی تنش خشکی و رشد مجدد به دست آمد (جدول ۱). این روند نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش و

اختیار باشد، چمن‌ها را در مقابل تنش خشکی حفاظت کرد و آنها را سبز نگه داشت.

سپاسگزاری

امکانات لازم برای انجام این پژوهش توسط دانشگاه گیلان فراهم گردیده است که بدین وسیله مراتب قدردانی اعلام می‌گردد.

توجه به این که میزان تولید ROSها از میزان فعالیت آنتی اکسیداتیو گیاه بیشتر شد و میزان نشت یونی و میزان تخریب کلروفیل نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت، کارکردهای فیزیولوژیک این گونه مختل گردید. بنابراین، با مشخص کردن آستانه تحمل هر گیاه می‌توان با آبیاری در زمان‌های بحرانی و با مصرف آب کمتر تا زمانی که آب کافی برای آبیاری مجدد در

منابع

- Alizadeh, A. (2004) Soil and plant water relations. Imam Reza University Press, Mashhad (in Persian).
- Anderson, M. D., Prasad, T. K. and Stewart, C. R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109: 1247-1257.
- Arghavani, M., Kafi, M., Babalar, M. and Nadari, R. (2010). A physiological and morphological study on *Lolium perenne* L. and *Poa pratensis* L. as affected by trinexapac-ethyl, mowing management and nitrogen source under salt stress conditions. PhD thesis, University of Tehran, Karaj, Iran (in Persian).
- Arnon D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Aspinall, D. and Paleg, I.G. (1981) Proline accumulation: physiological aspects, physiology and biochemistry of drought resistance. Australian Academic Press, Sydney.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, L. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bian, S. and Jiang, Y. (2009) Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae* 120: 264-270.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Dabrowska, G., Kata, A., Goc, A., Hebda, M. S. and Skrzypek, E. (2007) Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 49: 7-17.
- Davis, D. G. and Swanson, H. R. (2001) Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and Experimental Botany* 46: 95-108.
- Diego, A. M., Oliva, M. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- Egert, M. and Tevini, M. (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany* 48: 43-49.

- Fu, J., Fry, J. and Huang, B. (2004) Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. *Horticulture Science* 39: 1740-1744.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Hare, P. D., Cress, W. A. and Staden, J. V. (1999) Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50: 413-434.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, A. M. M., Karimi, M. and Ghanati, F. (2011) Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. *Acta Physiologia Plantarum* 33: 105-112.
- Hosseini Boldaji, S. A., Khavari-Nejad, R. A., Hassan Sajedi, R., Fahimi, H. and Saadatmand, S. (2012) Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologia Plantarum* 34: 1177-1186.
- Inze, D. and Van Montagu, M. (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion Biotechnology* 6: 153-158.
- Kavitha, K., Venkataraman, G. and Parida, A. (2008) An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: molecular and functional characterization. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 794-804.
- Kocheiki, A. and Nasiri Mahalati, M. (1994) Ecology of plants. 2nd edition. Jahad Daneshgahi Mashhad Press, Mashhad (in Persian).
- Kuznetsov, V. V. and Shevyakova, N. I. (1999) Proline under stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 274-286.
- Morgan, J. M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 335-339.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Nalouisi, A. M., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, M. and Biglouei, M. H. (2014) Effect of exogenous sodium nitroprusside on drought resistance of creeping bentgrass and tall fescue. *Iranian Society For Horticultural Science* 14(4): 427-438.
- Ranney, T. G., Bassuk, N. L. and Whitlow, T. H. (1991) Osmotic adjustment and solute contributes in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 684-688.
- Santos, C. V. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Environmental Science Horticulture* 103: 93-99.
- Shaoyun, L., Su, W., Li, H. and Guo, H. (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂ and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 132-138.
- Salahvarzy, Y., Tehrani, A. and Gazanchian, A. (2008) Physiomorphological changes under drought stress and rewatering in endemic and exotic turfgrasses. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 9(3): 193-204 (in Persian).
- Wang, Z. and Huang, B. (2004) Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Science* 44: 1729-1736.
- Xu, R., Yamada, M. and Fujiyama, H. (2013) Lipid peroxidation and antioxidative enzymes of two turfgrass species under salinity stress. *Pedosphere* 23(2): 213-222.

تأثیر القای تتراپلوئیدی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)

مهسا باقری و حکیمه منصوری *

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) با روش قطره چکان در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۲ درصد کلشی سین در مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. به منظور تعیین سطح پلوئیدی، آنالیز فلوسایتومتری انجام شد و صفات مورفولوژیک و ساختاری گیاهان تتراپلوئید القایی و دیپلوئید بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده بهترین غلظت کلشی سین جهت القای تتراپلوئیدی ۰/۲ درصد بود. با افزایش مدت زمان تیمار، درصد گیاهان تتراپلوئید و درصد زنده مانگی کاهش یافت. همچنین، شاخص برگ (عرض/طول) و ارتفاع گیاهان تتراپلوئید کاهش معنی داری در مقایسه با گیاهان دیپلوئید نشان داد. اندازه روزنه اپیدرم برگ گیاهان تتراپلوئید بزرگتر از گیاهان دیپلوئید بود در حالی که این گیاهان تراکم روزنه ای کمتری داشتند. مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید تفاوت معنی داری نداشت. همچنین، برش عرضی ساقه این گیاهان تفاوت‌هایی از نظر ساختار تشریحی نشان داد. نتایج نشان داد که شاخص‌های روزنه ای راه مؤثر و آسانی برای تشخیص گیاهان تتراپلوئید است در حالی که برای تشخیص درصد پلوئیدی، آنالیز فلوسایتومتری توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تتراپلوئیدی، صفات مورفولوژیک، فلوسایتومتری، کلشی سین، گیاه شاهدانه

مقدمه

شده‌اند (Mechoulam and Gaoni, 1967). پس از پیشرفت‌هایی که در سنتز کانابینوئیدهای نظیر نابیلون (nabilone) (Ward and Holmes, 1985) و آجولمیک اسید (ajulemic acid) (Burstein et al., 1992) به دست آمد، واژه فیتوکانابینوئید برای ترکیبات ویژه شاهدانه پیشنهاد شد (Pate, 1999). تجمع

شاهدانه (*Cannabis sativa*) از قدیمی‌ترین گیاهانی است که به دلیل داشتن فیبر و ویژگی‌های دارویی در صنعت نساجی و طب سنتی به وفور استفاده می‌شود. کانابینوئیدها گروهی از ترکیبات ترپنوفنولیک ۲۱ کربنه هستند که فقط در گیاه شاهدانه شناسایی

(*autumnale* L.) امکانات وسیعی در القای پلی‌پلوئیدی ایجاد کرده است (Hassawi and Liang, 1991).

تغییر در سطح پلوئیدی، تعدادی از صفات تشریحی و مورفولوژیک نظیر: ضخامت برگ، ساقه‌ها و ریشه‌ها، نسبت طول به عرض برگ، اندازه روزنه، اندازه و بافت گل، دوره گل‌دهی و قطر دانه‌گرده را تغییر می‌دهد (Gao *et al.*, 1996). به علاوه، گیاهان پلی‌پلوئید پایه ژرم‌پلاسم وسیع‌تری برای مهندسی ژنتیک ایجاد می‌کنند (Thao *et al.*, 2003).

القای پلی‌پلوئیدی راهکاری مناسب برای اصلاح صفات دلخواه و روش به‌نژادی مؤثر برای ایجاد تنوع زیستی است (Griesbach and Bhat, 1990; Nakano *et al.*, 2006; Chakraborti *et al.*, 1998). القای تتراپلوئیدی می‌تواند روش مؤثری برای افزایش بیوماس و بهبود صفات دارویی و تزئینی باشد. برگ، ساقه و ریشه که اندام‌های مفید در گیاهان دارویی به شمار می‌آیند، در گیاهان تتراپلوئید معمولاً نسبت به گیاهان دیپلوئید بزرگتر هستند (Gao *et al.*, 1996).

در پژوهش حاضر، تتراپلوئیدی توسط کلشی سین القای شد، همچنین ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید القایی و تأثیر تتراپلوئیدی بر برش عرضی ساقه و گسترده‌گی فیبرها مطالعه شد.

کاشت گیاه: دانه‌های ضد عفونی شده شاهدانه در گلدان‌هایی پر شده با پرلیت با قطر ۱۰ سانتی‌متر کشت شد. پس از رویش، تعداد گیاهان به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت. گیاهان تا آغاز گل‌دهی (حدود ۱۲۰ روز) در فیتوترون گلخانه با حرارت روشنایی و

کانابینوئیدها بیشتر در تریکوم‌های غده‌ای گیاه شاهدانه مشاهده شده است (Hammond and Mahlberg, 1977). ترکیبات اصلی به صورت رزین در تریکوم‌های غده‌ای پایه‌های ماده فراوان تر هستند و از زمان نخستین ظهور گل‌ها تا زمان بالغ شدن دانه‌ها تولید می‌شوند (Duke, 2001). بر پایه میزان تتراهیدروکانابینوئید، گیاه شاهدانه دارای انواع فیبر و دارویی است.

دستکاری پلی‌پلوئیدی به طور موفقیت‌آمیز در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان، به منظور تسهیل تولید واریته‌های برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است. گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به انواع دیپلوئید همان گونه اغلب فنوتیپ جدیدی را نشان می‌دهند و از محدوده صفات اجداد دیپلوئید خود در ویژگی‌هایی نظیر: افزایش مقاومت به خشکی، آپومیکسی، مقاومت در برابر حشرات، افزایش بیوماس و تغییر در کیفیت و غلظت ترکیبات فعال برتر از گیاهان دیپلوئید هستند؛ در نتیجه، احتمال انتخاب آنها در کشاورزی افزایش می‌یابد (Zargari, 1998).

تمام گونه‌های طبیعی و هیبرید جنس شاهدانه دیپلوئید هستند و نوع پلی‌پلوئید آن به طور طبیعی بسیار نادر است. بنابراین، تولید تتراپلوئید در شاهدانه نیازمند القای مصنوعی لاین‌های تتراپلوئید است. دو برابر کردن عدد کروموزومی می‌تواند با استفاده از مهارکننده‌های دوک میتوزی به دست آید. ترکیبات شیمیایی جهش‌زا با جلوگیری از پلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها و به دنبال آن مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها در آنافاز، میتوز را مختل می‌کنند. استفاده از کلشی سین، آلکالوئید استخراج شده از دانه و ساقه گیاه سورنجان پاییزی (*Colchicum*)

یک دقیقه برای شمارش به دستگاه داده شد. به طور معمول، برای هر نمونه حجم حداقل ۵۰۰۰ هسته توسط دستگاه اندازه‌گیری و پیک‌های به دست آمده با نرم‌افزار Mode Fit تفسیر گردید.

مقایسه ویژگی‌های ظاهری بین گیاهان

تتراپلوئید و دیپلوئید: پس از شناسایی گیاهان تتراپلوئید ۱۰۰ درصد (خالص) از طریق آنالیز فلوسایتمتری، گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید از نظر شکل برگ، سطح برگ، شاخص‌های روزنه‌ای، ارتفاع، وزن تر ساقه و ریشه، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با هم مقایسه شدند.

ارزیابی شاخص‌های روزنه‌ای در گیاهان

تتراپلوئید و دیپلوئید: بدین منظور، برگ دوم از گیاهان تتراپلوئید ۱۰۰ درصد (خالص) و دیپلوئید در مرحله ۶ جفت برگ حقیقی جدا شد. سپس طرحی از لایه اپیدرم زیری برگ توسط لاک ناخن بی‌رنگ برداشته شد. بدین منظور بخشی از برگ (۵×۱۰ سانتی‌متر) که ترجیحاً فاقد رگبرگ اصلی بود توسط لاک پوشانده و پس از ۱۲ دقیقه خشک شد. لاک خشک شده توسط یک انبرک تیز از گوشه برداشته شد، روی لام گذاشته و با لامل پوشیده شد و با میکروسکوپ نوری در دو بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۴۰ برای محاسبه شاخص‌های روزنه‌ای بررسی شد. برای هر نمونه سه اسلاید تهیه شد و طول و عرض ۲۰ نمونه در هر اسلاید با عدسی میکرومتری اندازه‌گیری شد (Hamill et al., 1992). برای تعیین تراکم روزنه‌ای در اسلایدهای تهیه شده از گیاهان شاهد و تتراپلوئید، ۵ میدان دید میکروسکوپی برای هر نمونه محاسبه گردید.

تاریکی ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت قرار گرفتند و یک روز در میان با محلول هو گلند ۱/۲ آبیاری شدند (Hoagland and Arnon, 1950).

برای القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه، مریستم رأسی ۱۸۰ گیاهچه در مرحله رشد دو برگ اولیه (۷ روزه) با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد از محلول آبی کلشی‌سین به همراه ۰/۵ درصد دی‌متیل سولفو کسید و توین ۲۰ به عنوان سورفاکتانت، با روش قطره چکان در دو مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعتی با فواصل زمانی به ترتیب ۶ و ۱۲ ساعت تیمار شد. در زمان اعمال تیمار، گیاهچه‌های تیمار شده با پلاستیک پوشیده شدند تا از زود خشک شدن محلول کلشی‌سین جلوگیری شود.

تعیین سطح پلوئیدی با دستگاه فلوسایتمتری:

دستگاه فلوسایتمتر برای برآورد صحیح میزان DNA هسته‌ای گیاهانی که از نظر ظاهری تتراپلوئید شناخته شدند استفاده شد. گیاهان شاهد نیز برای مقایسه استفاده شدند و قله به دست آمده از آنها مبنای مقایسه میزان ژنوم هسته قرار گرفت. در این پژوهش، برای آنالیز سطح پلوئیدی، از برگ‌های دوم گیاهان، ۵۰ روز پس از اعمال تیمار، قطعاتی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه شد، ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه) روی آنها ریخته شد و مقاطع برگ با تیغ تیز (به منظور جلوگیری از له‌شدگی بافت) کاملاً له شد. سپس محلول به دست آمده از صافی‌های دستگاه عبور داده شد، ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی هسته DAPI (محلول B کیت) به آن افزوده و پس از گذشت

(شامل کاروتن و گرانوفیل) است (Lichtenthaler, 1987). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب گرم/میلی‌گرم وزن تر محاسبه و ارایه گردید.

رابطه ۱: $Chl.a=(12.25A_{663.2}-2.79A_{646.8})$

رابطه ۲: $Chl.b=(21.51A_{646.8}-5.1 A_{663.2})$

رابطه ۳: $Chl.T=Chl.a+Chl.b$

رابطه ۴:

$Car=[(1000A_{470}-1.8 Chl.a-85.02 Chl.b)/198]$

تحلیل آماری: تمامی مراحل آزمایش با ۳ تکرار

انجام شد، میانگین‌ها با آزمون توکی در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ در سطح احتمال ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نتایج

القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه: شدت

فلورسانس هسته گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید توسط دستگاه فلوسیتومتر مشخص شد. در نمایه‌های رسم شده توسط فلوسیتومتر، محور Y نشان دهنده تعداد هسته‌های شمارش شده و محور X نشان دهنده شدت فلورسانس نسبی DNA است که بیانگر حجم DNA هسته‌ها است. در نمایه‌های فلوسیتومتری هسته‌هایی که دارای مقادیر مساوی DNA هستند، یک قله (پیک) را تشکیل می‌دهند. یک قله G1 و قله دیگر (با میزان دو برابر) فاز G2/M سیکل سلولی را مشخص می‌سازد. قله G1 و قله G2 نمونه دیپلوئید به ترتیب شدت فلورسانس ۲۷ و ۵۴ را نشان دادند در حالی که قله G1 و قله G2 نمونه تتراپلوئید به ترتیب شدت فلورسانس ۴۸/۳۳ و ۹۴/۵۶ را نشان داد (شکل ۱).

تهیه برش عرضی ساقه: برای بررسی ساختار

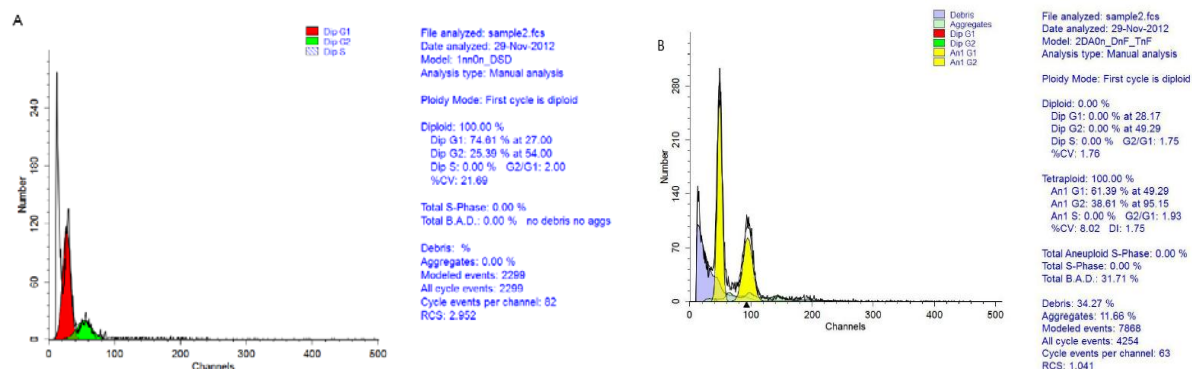
تشریحی ساقه، از میان گره سوم ساقه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید پس از ۷۵ روز به طور دستی برش‌گیری شد. قطعه یک سانتی‌متری از میان گره سوم در بین دو قطعه یونولیت قرار گرفت و برش نازک توسط اسکالپل گرفته شد. برش تهیه شده روی لام قرار گرفت و با میکروسکوپ نوری مدل زایس با بزرگ‌نمایی ۱۰ مطالعه شد.

محاسبه سطح برگ گیاهان دیپلوئید و

تتراپلوئید: برای مقایسه سطح برگ در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید، برگ سوم از رأس ساقه هر گیاه جدا شد. از برگ‌های جدا شده کپی کاغذی تهیه و وزن کپی مورد نظر با ترازو اندازه‌گیری شد. یک سانتی‌متر مربع از کادر کاغذ نیز جداگانه وزن شد، با محاسبه نسبت وزن برگ به وزن یک سانتی‌متر مربع از کاغذ (رابطه تناسبی) سطح هر برگ محاسبه و مقایسه شد.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئید: برای سنجش

میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی همراه با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از صاف کردن، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل Cary-50، شرکت Varian، استرالیا) در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای تنظیم دستگاه از استون ۸۰ درصد به عنوان شاهد استفاده گردید. غلظت رنگیزه‌های گیاهی با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۴ محاسبه گردید. $Chl.a$ ، $Chl.b$ ، $Chl.T$ و Car به ترتیب: غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها



شکل ۱- هیستوگرام محتوای DNA استخراج شده از برگ گیاهان دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) گیاه شاهدانه

بین گیاهان تتراپلوئید و گیاهان دیپلوئید مشاهده شد (جدول ۱). نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید شاهدانه افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان دادند. بررسی تراکم روزنه‌ای نیز نشان داد که افزایش سطح پلوئیدی، تراکم روزنه‌ای نسبت به گیاهان دیپلوئید را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. به طور کلی، گیاهان تتراپلوئید روزنه بزرگتر با تراکم کمتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشتند. در این پژوهش، اندازه روزنه (طول×عرض) در گیاهان دیپلوئید برابر با $19/2 \pm 0/00084 \times 11/2 \pm 0/00107$ و برای گیاهان تتراپلوئید برابر با $38/4 \pm 0/00168 \times 33/6 \pm 0/00032$ میکرومتر بود.

مقایسه ارتفاع: نتایج حاصل از مقایسه ارتفاع (شکل ۴) نشان داد که ارتفاع گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۱).

مقایسه میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید: نتایج حاصل از مقایسه میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید کل بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید تفاوت معنی‌داری را نشان

مدت زمان تیمار بر درصد زنده مانگی و تعداد گیاه تتراپلوئید خالص تأثیر معنی‌داری داشت. با افزایش مدت زمان تیمار درصد گیاهان تتراپلوئید و درصد زنده مانگی کاهش یافت. به طوری که در گیاه شاهدانه اعمال غلظت ۰/۲ درصد کلشی‌سین به مدت ۲۴ ساعت بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید خالص (۱۶/۳۶ درصد) با زنده مانگی ۸۱/۱۰۰ درصد را تولید کرد و دو غلظت دیگر در دو مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت هیچ گیاه تتراپلوئیدی را تولید نکرد.

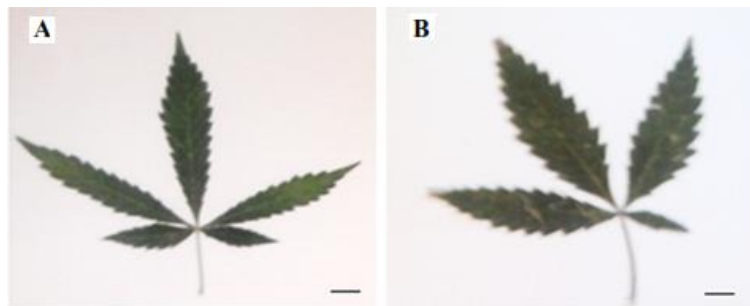
مقایسه شکل و سطح برگ: بررسی شکل برگ (شکل ۲) نشان داد که سطح برگ گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید شاهدانه به طور معنی‌داری افزایش یافته است (جدول ۱). علاوه بر این، برگ گیاهان تتراپلوئید چین‌خورده و ناصاف بودند. همچنین، گیاهان تتراپلوئید برگ‌های کوتاه‌تر با عرض بیشتری داشتند و شاخص برگ (عرض/طول برگ) از ۴/۴۷ به ۲/۶۸ کاهش داشت (جدول ۲). در برخی از برگ‌های گیاهان تتراپلوئید تعداد برگچه‌ها از ۵ به ۴ کاهش یافت (شکل ۲).

مقایسه طول، عرض و تراکم روزنه: تغییرات معنی‌داری در شاخص‌های روزنه‌ای برگ (شکل ۳)

نداد (جدول ۱).

گیاه دیپلوئید توسعه بیشتری نشان می‌دهد (شکل ۵). در مقابل، فیبر اولیه و ثانویه در گیاه دیپلوئید توسعه بیشتری نشان داد.

مقایسه برش عرضی: در برش عرضی ساقه گیاهان تتراپلوئید مشاهده شد که بافت آوند چوبی در مقایسه با



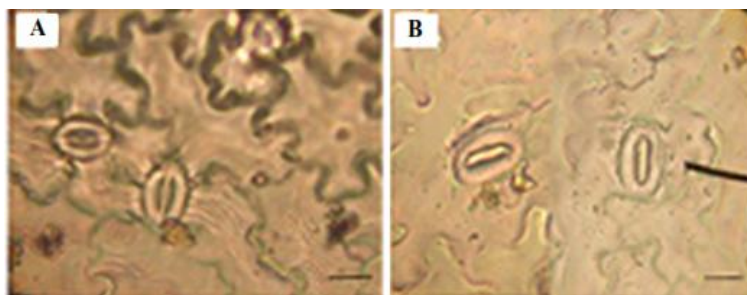
شکل ۲- مقایسه شکل برگ در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۲ سانتی‌متر)

جدول ۱- مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خالص شاهدانه. مقادیر میانگین \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از آزمون توکی است.

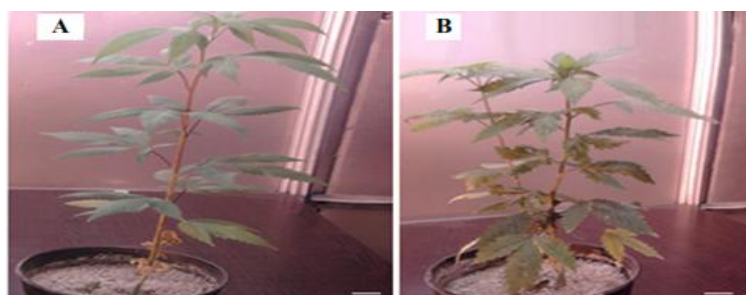
ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری بررسی شده	تتراپلوئید	شاهد
طول روزنه (میکرومتر)	۳۸/۴ \pm ۰/۰۰۱۶۸a*	۱۹/۲ \pm ۰/۰۰۰۸۴b
عرض روزنه (میکرومتر)	۳۳/۶ \pm ۰/۰۰۳۲a	۱۱/۲ \pm ۰/۰۰۱۰۷b
تراکم روزنه (میلی‌متر مربع)	۱۳/۸ \pm ۰/۷۵۷b	۲۳/۳ \pm ۰/۸۷a
سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	۶/۴۳ \pm ۰/۰۷۸۹۴a	۵/۴۳ \pm ۰/۰۷۸۹۵b
ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	۳۰/۸۵ \pm ۰/۴۲۱۹۷b	۳۵/۶ \pm ۰/۳۹۲۹۹a
کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱۰/۲۰۳ \pm ۰/۵۹۱۸a	۹/۸۴۱ \pm ۰/۱۸۴۳a
کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۵/۱۹۶ \pm ۰/۱۹۶۰۳a	۴/۷۹۹ \pm ۰/۱۶۶۵۴a
کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱۶/۱۹ \pm ۰/۷۰۱۰۴a	۱۴/۶۵۲ \pm ۰/۲۶۲۸۲a
کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۲/۰۸ \pm ۰/۱۲۸۳a	۲/۱۲۳ \pm ۰/۰۷۶۹a

جدول ۲- مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک برگ در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خالص شاهدانه. * حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از آزمون t دوجفتی است.

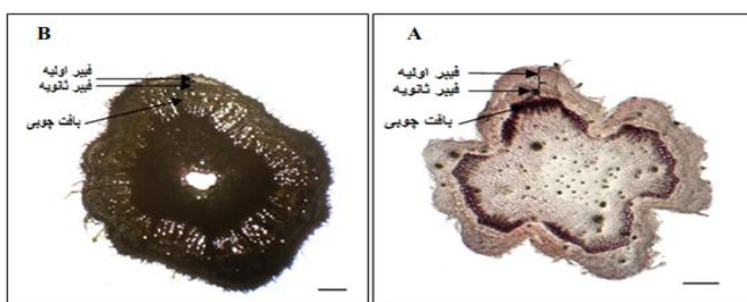
سطح پلوئیدی	طول برگ (سانتی‌متر)	عرض برگ (سانتی‌متر)	شاخص برگ (عرض/طول)
دیپلوئید	۶/۹۵ \pm ۰/۰۸۸۵۱a	۱/۵۷ \pm ۰/۰۶۱۵۵b	۴/۴۷ \pm ۰/۱۵۴۱۳a
تتراپلوئید	۶/۲۱ \pm ۰/۱۵۵۲۴b	۲/۳۲ \pm ۰/۰۷۸۶a	۲/۶۸ \pm ۰/۰۷۹۷۲b
معنی‌داری *	*	*	*



شکل ۳- مقایسه شاخص‌های روزنه‌ای در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۲۵ میکرومتر)



شکل ۴- مقایسه ارتفاع در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۵ سانتی‌متر)



شکل ۵- مقایسه ساختار تشریحی ساقه در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۵ میکرومتر)

بحث

القای پلی‌پلوئیدی نقش مهمی در به‌نژادی گیاهان دارد و روش سودمندی برای ایجاد تنوع است. گیاهان تتراپلوئید به دلیل دارا بودن ویژگی‌های برتر در مقایسه با نوع دیپلوئیدشان بیشتر در زراعت و باغبانی مورد توجه قرار می‌گیرند. برای نمونه، گیاهان تتراپلوئید دارای ساقه و ریشه ضخیم‌تر، گل‌ها و برگ‌های بزرگ‌تر، عادت رویشی منظم‌تر و مقاومت

بیشتر در برابر تنش‌های زیستی هستند (Kermani *et al.*, 2003). از سوی دیگر، پلی‌پلوئیدی می‌تواند دارای آثار مضری نظیر افزایش اندازه سلولی که به ناهماهنگی‌های ساختاری منجر می‌شود نیز باشد. آثار زیان‌بار دیگر می‌تواند شامل عقیمی، شکنندگی چوب و آبکی شدن میوه باشد (Sanford, 1983). در پژوهش حاضر، القای تتراپلوئیدی با غلظت ۰/۲ درصد کلشی‌سین و روش قطره چکان موجب القای

ساختار تشریحی ساقه نشان داد که آوند چوبی پسین در گیاه ترپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید توسعه بیشتری داشته است و برعکس فیبر اولیه و ثانویه توسعه کمتری داشته‌اند که احتمالاً علت هورمونی دارد. بنابراین، نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که القای ترپلوئیدی برای واریته فیبری شاهدانه سودمند نیست.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر در ارتباط با محتوای کلروفیل با القای پلی‌پلوئیدی در گیاه *Citrus ourantifolia* مشابه بود و از این نظر تغییر معنی‌داری بین گیاهان دیپلوئید و ترپلوئید مشاهده نشد (Afshar Mohamadian et al., 2012).

با توجه به معنی‌دار نبودن تغییر ترکیباتی نظیر کلروفیل و کاروتنوئید، می‌توان عنوان کرد که این شاخص‌ها برای تشخیص گیاهان ترپلوئید دقیق و قابل اطمینان نیستند (Phulari, 2011). معمولاً از شاخص‌های روزنه‌ای که آسان و غیر مخرب است و نیازی به وسایل گران قیمت ندارد به عنوان شاخص سطح پلوئیدی در گیاهان استفاده می‌شود (Kadota and Niimi, 2002؛ Thao et al., 2003). با استفاده از این روش در پژوهش حاضر، جمعیت گیاهی از ۱۲۰ گیاه تیمار شده به ۱۰ گیاه ترپلوئید کاهش یافت و آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که ۴ گیاه ترپلوئید ۱۰۰ درصد و ۱ گیاه شیمیر است. همچنین برگ تمامی گیاهان ترپلوئید خالص، ظاهری چروکیده نشان دادند که می‌تواند برای شناسایی اولیه گیاهان ترپلوئید شاهدانه در نظر گرفته شود. در نتیجه، شاخص‌های روزنه‌ای راهی مؤثر و سریع برای تشخیص گیاهان ترپلوئید است در حالی که برای تشخیص درصد سلول‌های شیمیری آنالیز فلوسایتومتری مؤثر است.

ترپلوئیدی خالص شد. در زمان برداشت گیاه، وضعیت روزنه‌ها برای اطمینان از حالت پلوئیدی مجدداً بررسی شد. در پژوهش‌های پیشین نیز دیده شده است که ایجاد گیاه دارویی ترپلوئید خالص امری دشوار است و معمولاً شیمیر ایجاد می‌شود برای نمونه، در تیمار مریستم رأسی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) در شرایط کشت درون شیشه‌ای، استفاده از غلظت‌های مختلف کلشی سین در مدت زمان‌های مختلف گیاه ترپلوئیدی تولید نکرد (Sarikhani et al., 2010).

رشد اولیه گیاهان ترپلوئید خالص شاهدانه در مقایسه با گیاهان شاهد در ماه نخست پس از تیمار کندتر بود، در نتیجه گیاهان ترپلوئید ارتفاع کمتری نشان می‌دادند. موافق با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، القای پلی‌پلوئیدی در گیاه بابونه (Saharkhiz, 2007) و گیاه *Platanus acerifolia* (Guofeng et al., 2007) با کاهش رشد همراه بود. رشد کمتر گیاهان پلی‌پلوئید می‌تواند به علت کاهش سرعت تقسیم سلولی (Eigsti, 1947)، کاهش هورمون‌های رشد (Larsen and Mintung, 1950) و فعالیت کمتر متابولیت‌ها در این گیاهان باشد. با توجه به مشاهدات Joshi و Verma (۲۰۰۴) گیاهان لوبیای اتوترپلوئید در ابتدا رشد کمتری داشتند اما به علت تولید محصول بیشتر، اهمیت دارند. القای پلی‌پلوئیدی موجب کاهش نسبت طول به عرض برگ‌ها می‌شود (Pryor and Frazier, 1968). در تحقیق حاضر نیز القای پلی‌پلوئیدی در گیاه شاهدانه به کاهش شاخص برگ منجر شد. القای پلی‌پلوئیدی در گیاه *Phlox Subulata* L. نیز نتیجه مشابهی نشان داده است (Zhihong et al., 2008).

گیاه شاهدانه دو واریته فیبری و دارویی دارد. مطالعه

جمع‌بندی

نتایج حاضر اطلاعات اولیه در ارتباط با القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه با استفاده از تیمار جوانه رأسی با کلشی‌سین و تأثیر آن بر برخی صفات مورفولوژیک و ساختاری را فراهم آورده است. این اطلاعات می‌تواند در مراحل بعدی در پژوهش‌های اصلاحی و به‌نژادی این گیاه دارویی ارزشمند توسط

محققان استفاده شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از جناب آقای دکتر عباس‌نژاد مدیر گروه محترم بخش زیست‌شناسی و حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه باهنر کرمان سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Afshar Mohamadian, M., Pourakbari Kasmaei, R., Omid, Z. Ghanati, F. and Tarang, A. (2012) Morphologic and physiologic effects on polyploidy induction in *Citrus aurantifolia*. Iranian Journal of Plant Biology 5(17): 15-30 (in Persian).
- Burstein, S. H., Audette, C. A. and Breuer, A. (1992) Synthetic non psychotropic cannabinoids with potent anti-inflammatory, analgesic and leukocyte antiadhesion activities. Journal of Medicinal Chemistry 35: 3135-3141.
- Chakraborti, S. P., Vijayan, K., Roy, B. N. and Qadri, S. M. H. (1998) *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Reports 17: 799-803.
- Duke, J. A. (2001) Handbook of medicinal herbs. CRC Press, New York.
- Eigsti, O. J. (1947) The pollen tube method for making comparisons of differences in mitotic rates between diploid and tetraploid. Genetics 1: 32-85.
- Gao, S. L., Zhu, D. N., Cai, Z. H. and Xu, D. R. (1996) Autotetraploid plants from colchicine treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 73-77.
- Griesbach, R. J. and Bhat, R. N. (1990) Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. Horticultural Science 25: 1284-1286.
- Guofeng, L., Zhineng, L. and Manzhu, B. (2007) Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica 157: 145-154.
- Hamill, S. D., Smith, M. K. and Dodd, W. A. (1992) *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal of Botany 40: 887-896.
- Hammond, C. T. and Mahlberg, P. G. (1977) Morphogenesis of breeding of cannabis: determination of cannabinoids by capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* (Cannabinaceae). American Journal of Botany 64: 1023-1031.
- Hassawi, S. D. and Liang, G. H. (1991) Antimitotic agents: effects of double haploid production in wheat. Crop Science 31: 723-726.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. University of California, Berkeley.
- Joshi, P. and Verma, R. C. (2004) High frequency production of colchicine induced autotetraploids in faba bean (*Vicia faba* L.). Cytologia 69: 141-147.
- Kadota, M. and Niimi, Y. (2002) *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear

- cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Reports 21: 282-286.
- Kermani, M. J., Sarasan, V., Roberts, A. V., Yokoya, K., Wentworth, J. and Sieber, V. K. (2003) Oryzalin-induced chromosome doubling in rosa and its effect on plant morphology and pollen viability. Theoretical and Applied Genetics 107: 1195-1200.
- Larsen, P. and Mintung, S. (1950) Growth promoting and growth retarding substances in pollen from $2n$ and $3n$ apple varieties. In: Polyploidy and biological relevance (Ed. Lewis, W. H.) 436-444. Plenum Press, New York.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.
- Mechoulam, R. and Gaoni, Y. (1967) Recent advances in the chemistry of hashish. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe 25: 175-213.
- Nakano, M. T., Nomizu, K., Mizunashi, M., Suzuki, S., Mori, S., Kuwayama, M., Hayashi, H., Umehara, E., Kobayashi, H., Asano, M., Sugawara, S., Takagi, H., Saito, H., Nakata, M., Godo, T., Hara, Y. and Amano, J. (2006) Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures. Horticultural Science 110: 366-371.
- Pate, D. (1999) Anandamide structure-activity relationships and mechanisms of action on intraocular pressure in the normotensive rabbit model. PhD thesis, University of Kuopio, Kuopio, Finland.
- Phulari, S. S. (2011) Polyploidy breeding in *Urgenia indica* to study the effect of colchicines treatment on morphological character of *Urgenia indica*. Botany 1(3): 207-210.
- Pryor, R. L. and Frazier, L. C. (1968) Colchicine-induced tetraploid azaleas. Horticultural Science 3(4): 283-286.
- Saharkhiz, M. J. (2007) Effects of some environmental factors and ploidy level on some morphology and also potology properties of medicinal and ornamental *Tanacetum Parthenium* plant. PhD thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (in Persian).
- Sanford, J. C. (1983) Ploidy manipulations. In: Methods in fruit breeding (Eds. Moore, J. N. and Janick, J.) 100-123. Purdue University Press, West Lafayette.
- Sarikhani, H., Borgheei S. F., Chaichi, M. and Kashi A. (2010) *In vitro* induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 26(3): 283-295 (in Persian).
- Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. and Okubo, H. (2003) Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72: 19-25.
- Ward, A. and Holmes, B. (1985) Nabilone, a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic use. Drugs 30: 127-144.
- Zargari, A. (1998) Medicinal plants. Tehran University Press, Tehran (in Persian).
- Zhihong, Z., Hongyan, D., Min, X. and Xin, L. (2008) *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L.. Euphytica 159: 59-65.

مطالعه و بررسی الگوی بیان ژن *AUX1* و تأثیر آن در ایجاد ریشه‌های نابجا در قلمه‌های زیتون (*Olea europaea* L.)

وحیده هدایتی^۱، امیر موسوی^{۱*}، فیامتا آلاگنا^۲، ساوریو پاندولفی^۲، خدیجه رضوی^۱، لوسیانا بالدونی^۲ و سید مهدی حسینی مزینانی^{۱*}
^۱ گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
^۲ مؤسسه تحقیقات علوم زیستی و منابع زیستی (CNR-IBBR)، پروجا، ایتالیا

چکیده

زیتون (*Olea europaea* L.) از مهم‌ترین محصولات حوزه مدیترانه است که صرفاً با قلمه تکثیر می‌شود. اگرچه ظرفیت ریشه دهی پایین در برخی از ارقام کارآیی تکثیر غیرجنسی زیتون را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد اما رشد ریشه‌های نابجا مرحله کلیدی در تکثیر رویشی این گیاه است. ژن ناقل برون شارش اکسین ۱ (*AUX1*) نقش کلیدی را در تشکیل ریشه جانبی در بسیاری از گونه‌های گیاه ایفا می‌کند. این ژن صدور IAA از برگ‌های تازه نمو یافته به پرموردیای ریشه جانبی را تحریک می‌کند. همولوگ پیش فرض این ژن در زیتون با روش طراحی آغازگر چندحالتی از مناطق حفاظت شده رونوشت‌های *AUX1* در گیاهان دیگر جداسازی شد. توالی رونوشت و آمینو اسید این ژن در ریشه (*OeAUX1R*) و انتهای قلمه (*OeAUX1B*) با هم تفاوت داشت. احتمالاً این چندشکلی‌ها می‌تواند مربوط به نقش کلیدی ژن در بافت‌های مختلف باشد. به منظور بررسی حالت‌های بیانی این ژن، آزمایش PCR در زمان واقعی روی قلمه‌های جمع‌آوری شده طی ریشه‌دهی از ژنوتیپ‌هایی با توان ریشه‌دهی بالا و پایین انجام شد. همچنین، بیان ژن در بافت‌های مختلف زیتون نیز بررسی گردید. نتایج مقدماتی نشان داد که بیان ژن‌های *OeAUX1R* و *OeAUX1B* در انتهای قلمه و ریشه ژنوتیپ‌های با ریشه‌دهی بالا افزایش می‌یابد و پیشنهاد می‌شود که *OeAUX1* در ریشه‌دهی زیتون دخالت دارد. همچنین بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که ژن *AUX1* در زیتون دارای ۸ اگزون است که توالی آن طی تکامل گیاهان حفاظت شده است.

واژه‌های کلیدی: زیتون (*Olea europaea* L.)، بیان ژن، ریشه‌دهی زیتون، ژن *AUX1*

مقدمه

محصولات میوه‌دار در حوزه مدیترانه و از قدیمی‌ترین

محصولات باغی است که عموماً برای استخراج روغن

زیتون (*Olea europaea* L.) یکی از فراوان‌ترین

هورمون‌ها در القای ریشه‌زایی قلمه‌های زیتون است (Sebastiani and Tognetti, 2004).

پرسش‌های بی‌پاسخ متعددی در زمینه تنظیم ژنتیکی صفت ریشه‌زایی در زیتون وجود دارد و بر اساس بررسی‌های انجام شده، اهداف مطالعه حاضر تاکنون در طرح‌های مشابه انجام نشده است.

با توجه به طولانی بودن مرحله نونهالی زیتون (۵ سال) و زمان‌بر بودن روش‌های اصلاح سنتی و ناکارآمد بودن این روش‌ها و با توجه به این که کیفیت پایین ریشه‌زایی از عوامل محدودکننده باغات زیتون به شمار می‌رود، اصلاح ضعف ریشه‌زایی و افزایش کارایی آن موجب افزایش مزیت‌های اقتصادی قلمه‌های زیتون و کاهش مدت زمان ایجاد باغستان‌های آن می‌شود (Sebastiani and Tognetti, 2004). از دیگر مزایای ریشه‌زایی، افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی است (Santos Macedo et al., 2009).

هدف از مطالعه حاضر، شناسایی و بررسی ژن‌ها یا ژن‌های تأثیرگذار در فرآیند ریشه‌زایی در قلمه‌های زیتون است. از آنجا که قابلیت ریشه‌زایی از جمله مشکلات مطرح در تولید و تکثیر پایه‌های مطلوب زیتون در ایران است، با شناسایی ژن‌ها یا ژن‌های دخیل در ریشه‌زایی می‌توان درختان زیتون با توان ریشه‌دهی بالا را در مراحل نونهالی شناسایی نمود و از این ویژگی در برنامه‌های اصلاح و به‌نژادی زیتون استفاده کرد، ضمن این که تکثیر غیرجنسی ارقام ارزشمند ایرانی با درک سازوکار ژنتیکی بهبود خواهد یافت. به طور کلی، نتایج این تحقیق پاسخگوی مشکلات اساسی در مطالعات ژنومیک و برنامه‌های به‌نژادی مولکولی زیتون در جهت بهبود و ارتقای ریشه‌زایی در ارقام کنسروی و روغنی زیتون ایران خواهد بود.

کشت می‌شده است (Wu et al., 2004). این گونه متعلق به تیره Oleaceae، دیپلوئید (2n=46)، هتروزیگوت و تک‌پایه است (Johnson, 1957). تکثیر زیتون با روش‌های جنسی و غیرجنسی صورت می‌گیرد. از کشت بذر برای دستیابی به تنوع ژنتیکی و از ازدیاد غیرجنسی برای تولید گیاهان مشابه با گیاه مادری استفاده می‌شود. سیستم ریشه‌دهی زیتون بسیار قوی است. با توجه به این که ۷۰ تا ۹۰ درصد تکثیر این گیاه به ریشه‌دهی موفق قلمه‌ها بستگی دارد (Santos Macedo et al., 2009)، شناسایی عوامل تنظیم‌کننده تولید ریشه اعم از عوامل ژنتیکی، وضعیت غذایی، مرحله فنولوژیکی، فیزیولوژی گیاه مادری و شرایط محیطی ضروری است (Santos Macedo et al., 2009). یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در کارایی گیاه، تنش‌های زیستی و غیرزیستی (شوری، خشکی و سرما) هستند که بر سرعت رشد و نمو و القای اندام‌هایی نظیر بخش‌های هوایی، ریشه و ریشه‌های موین تأثیرگذار هستند (Santos Macedo et al., 2009). همچنین، عوامل ژنتیکی نیز تأثیر به‌سزایی بر قابلیت ریشه‌زایی زیتون دارند (Wu et al., 2004).

با توجه به اهمیت این گیاه روغنی در ایران و جهان، لازم است تا ژن‌های مهم دخیل در فرآیند ریشه‌زایی شناسایی و همسانه‌سازی شود تا بتوان در فرآیندهای به‌گزینی از آن بهره‌برد و به انتخاب گیاهانی با ریشه‌دهی بالا در مراحل نونهالی کمک نمود.

تاکنون مطالعات اندکی پیرامون ژن‌های دخیل در ریشه‌زایی زیتون انجام شده است و تنها Santos Macedo و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۱۲) این موضوع را به صورت محدود در سطح مولکولی بررسی نموده‌اند در حالی که اغلب مطالعات بیانگر تأثیر ترکیباتی نظیر

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر، از جمعیت ژنتیکی حاصل از تلاقی دو رقم زیتون (Leccino به عنوان پایه مادری با ریشه‌دهی قوی و Dolce Agogia به عنوان پایه پدری با ریشه‌دهی ضعیف) و ۱۱۵ نتاج حاصله دارای تفرق برتر در صفت ریشه‌زایی نسبت به والدین استفاده شد. از هر کدام از نتاج حاصل از تلاقی، ۶ قلمه با دو تکرار تهیه شد. از هورمون IBA با غلظت ۲۰۰۰ ppm به منظور ریشه دار شدن استفاده گردید. قلمه‌ها در اتاقک رشد حاوی پرلیت استریل با رطوبت ۱۰۰ درصد و دمای ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از دو ماه، صفات ریشه‌زایی از جمله: تعداد قلمه‌های ریشه دار شده، درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. بر اساس این صفات، گیاهان با قابلیت ریشه‌دهی بالا و پایین انتخاب شدند. از این گیاهان در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری (به ترتیب T0، T1، T2، T3 و T4) قلمه تهیه شد. در فواصل زمانی یاد شده، از ناحیه پایین قلمه هر گیاه (یک سانتی‌متر انتهای قلمه زیر نخستین گره) نمونه‌برداری انجام و نمونه‌ها جهت استخراج RNA به سرعت در نیتروژن مایع فریز شد. همچنین، برای بررسی بیان ژن‌ها در اندام‌های مختلف، از گل، برگ، ریشه و انتهای قلمه یکی از نتاج با ریشه‌دهی بالا نیز نمونه‌برداری انجام گرفت.

انتخاب و جداسازی ژن کاندید

بر اساس پژوهش‌های Shen و همکاران (۲۰۱۰) و Corinne و همکاران (۲۰۱۲) چندین ژن دخیل در ریشه‌زایی انتخاب شد و از میان آنها ژن ناقل برون شارش اکسین ۱ (*AUX1*) انتخاب گردید. با توجه به این که این

ژن تاکنون در زیتون گزارش نشده بود، با نرم‌افزار (http://bioinfo.ut.ee/primer 3-Primer 3-0.40) از مناطق حفاظت شده در سایر گونه‌های زیتون یک آغازگر چندحالتی برای این ژن طراحی گردید. از ریشه و انتهای قلمه یکی از نتاج با ریشه‌دهی بالا RNA استخراج شد (QIAGEN, Cat No: 74904) پس از تیمار با *DNase* (Ambion, Cat No: 1011015) جهت حذف آلودگی DNA، ستر cDNA (Invitrogen, Cat No: 18080-093) صورت گرفت. همسانه‌سازی ژن در حامل pGEM T-easy vector 2.1 و توالی‌یابی توسط دستگاه Genetic Analyzer (مدل ABI PRISM 3130، شرکت Life Technologies، آمریکا) انجام شد.

بررسی کمی بیان ژن: PCR در زمان واقعی

(Real-Time PCR) با سایبرگرین[®] (Power SYBR Green, Applied Biosystem (AB) Lot: 1208368) به صورت تک مرحله‌ای و در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۵ میکرولیتر از سایبرگرین و ۱ میکرومولار از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از توالی ژن *AUX1* در انتهای قلمه و ریشه، با غلظت ۲ پیکومول بود. واکنش در دستگاه ABI طبق این شرایط انجام شد: یک چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه. منحنی ذوب در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه؛ ۶۰ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه رسم شد. داده‌ها بر اساس دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی بودند. تحلیل نتایج با روش Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) انجام شد و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری

$P < 0.01$ بررسی شد.

بررسی‌های بیوانفورماتیک: با استفاده از داده‌های توالی‌یابی ژنوم والد مادری (Leccino)، توالی‌هایی با تشابه بیش از ۹۰ درصد با توالی ژن *AUX1* گزارش شده در سایر گیاهان انتخاب شد. سپس با نرم‌افزار برخط Softberry (<http://linux1.softberry.com>) توالی mRNAهایی به دست آمد، هر کدام از توالی‌ها به طور جداگانه در پایگاه اطلاعاتی NCBI بلاست شدند تا توالی منطبق با ژن *AUX1* مشخص شود. با هم‌ردیفی توالی پیش‌گویی شده، ژن *AUX1* و توالی نوکلئوتیدی ژنوم والد مادری، تعداد اگزون و اینترون‌های این ژن مشخص شد. سپس با نرم‌افزار برخط ExPASy (<http://web.expasy.org/translate>) توالی پروتئینی این ژن مشخص و برای توالی مذکور در پایگاه اطلاعاتی NCBI بلاست انجام شد.

تحلیل آماری: آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین بیان ژن در زمان‌های مختلف برای نتایج به دست آمده از PCR با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۱ با نرم‌افزار R Console نسخه ۳/۰/۲ انجام شد.

نتایج و بحث

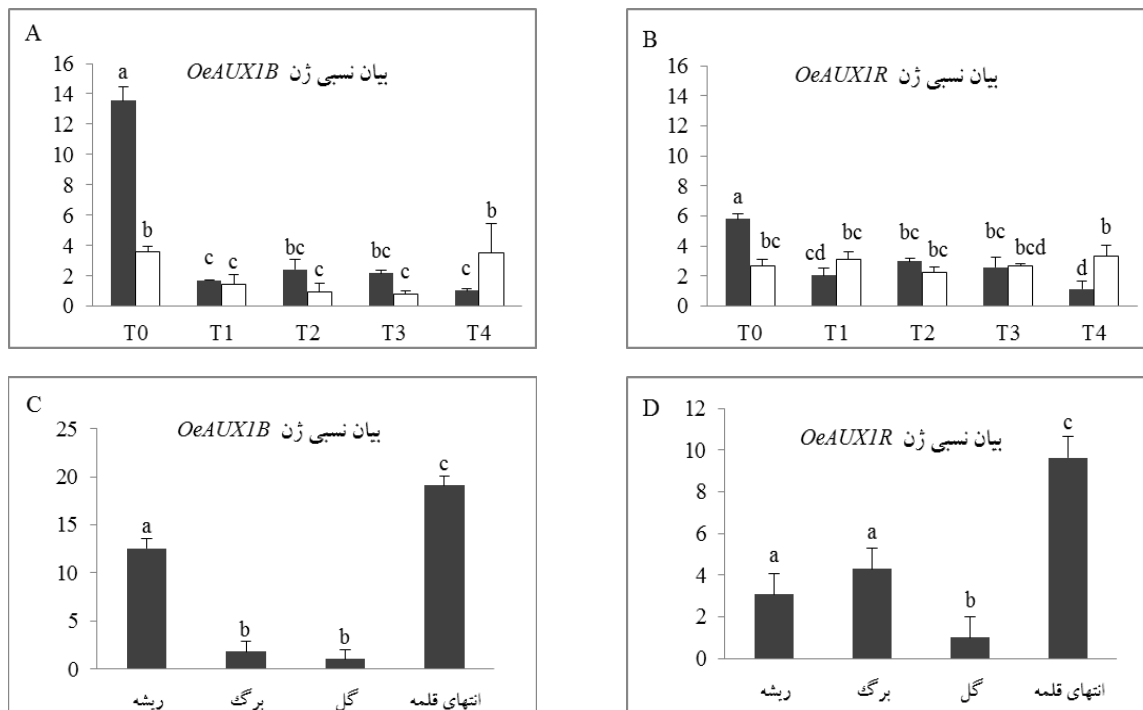
نتایج با ریشه‌دهی بالا (۱۰۰ درصد) و ریشه‌دهی پایین (۰ درصد) بر مبنای صفات ریشه‌زایی از جمله: تعداد قلمه‌های ریشه‌دار شده، درصد ریشه‌زایی، طول و تعداد ریشه‌ها شناسایی شدند. به دنبال آن، ژن *AUX1* در انتهای قلمه و ریشه در یکی از نتایج حاصل از تلاقی با ریشه‌دهی بالا همسانه‌سازی شد و نتایج نشان داد که توالی ژن در این دو منطقه دارای چندشکلی است به

طوری که توالی ژن *AUX1* جداسازی شده از انتهای قلمه و ریشه در سطح رونوشت و آمینو اسید به ترتیب ۸۴ و ۸۵ درصد با یکدیگر تشابه داشتند. بر این اساس، ژن جداسازی شده از ریشه و انتهای قلمه به ترتیب *OeAUX1R* و *OeAUX1B* نام‌گذاری شد. احتمالاً این چندشکلی نشان‌دهنده وجود دو آلل برای این ژن است که بر مبنای تفاوت بافت عمل می‌نمایند. با توجه نقش عمده اکسین‌ها در تشکیل ریشه‌های نابجا به ویژه در آغاز تشکیل و نمو پریموردیای ریشه‌های نابجا، افزایش تعداد ریشه‌های نابجا در اثر استفاده از اکسین خارجی و کاهش تعداد ریشه‌های نابجا در اثر ممانعت از انتقال اکسین (Fukaki and Tasaka, 2009)، بررسی الگوی بیان نسبی این ژن‌ها در بافت‌ها در زمان‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد. به این منظور از آزمون کمی PCR در زمان واقعی با دقت بسیار بالا جهت بررسی بیان استفاده گردید.

نتایج در زمان واقعی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *OeAUX1B* و *OeAUX1R* در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری برای نتایج با ریشه‌دهی بالا و پایین نشان داد که در نتایج با ریشه‌دهی بالا بیان هر دو ژن در زمان ۰ افزایش و سپس کاهش معنی‌داری داشت و در زمان‌های بعد میزان بیان تقریباً ثابت بود (شکل ۱-A و B). از سوی دیگر، بیان ژن *OeAUX1B* در نتایج با ریشه‌دهی پایین در زمان‌های ۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری اختلاف معنی‌داری با بیان همین ژن در سه زمان دیگر داشت، اما در مقایسه با نتایج با ریشه‌دهی بالا بیان این ژن در زمان ۰ تقریباً ۶ برابر بیشتر از بیان در نتایج با ریشه‌دهی پایین بود ضمن این که تفاوتی در میزان بیان ژن *OeAUX1R* طی

اکسین را مشاهده کردند که می‌تواند در بهبود ریشه‌زایی مؤثر باشد. همچنین گزارش شده است که محتوای اولیه و ترکیبات فنلی منتقل شده از گیاه مادری به قلمه‌ها، ممانعت از تجزیه اکسین در انتهای قلمه توسط ترکیبات فنلی و نیز میان‌کنش بین این متابولیت‌ها، اکسین‌ها و پراکسیدها می‌تواند تشکیل ریشه‌های نابجا را تحت تأثیر قرار دهد (De Klerk *et al.*, 1999). با توجه به این شواهد می‌توان احتمال داد که ژن *AUX1* در گیاهان با توان ریشه‌دهی بالا از ابتدا بیان بالایی داشته است به همین دلیل می‌تواند پس از قلمه‌گیری، اکسین بیشتری به انتهای قلمه منتقل کند و به ایجاد ریشه در این منطقه منجر شود.

مدت زمانی معین در نتاج با ریشه‌دهی پایین مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که با توجه به این که قلمه‌ها از شاخه‌های جدید گرفته شدند و بر اساس این که سطوح اکسینی که به صورت طبیعی در بافت‌های قلمه‌زده وجود دارد به گیاه مادری بستگی دارد (George *et al.*, 2008)، بنابراین سطوح بالای بیان ژن در زمان ۰ می‌تواند به علت توان بالای گیاه مادری در ایجاد ریشه باشد. Costa و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده‌اند که طی ساعات اولیه پس از جداسازی قلمه گیاه جاسمونات، ترکیبات فنلی و اکسین در انتهای قلمه به صورت محلی افزایش می‌یابند و بلافاصله پس از جداسازی قلمه‌ها از گیاه مادری، محتوای بالایی از



شکل ۱- الگوی بیان نسبی ژن‌های *OeAUX1B* و *OeAUX1R*. A و B: بیان ژن‌ها در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری (به ترتیب T0، T1، T2، T3 و T4) در یکی از نتاج با ریشه‌دهی بالا (سیاه) و یکی از نتاج با ریشه‌دهی پایین (سفید)؛ C و D: نحوه بیان ژن‌ها در بافت‌های گوناگون یکی از نتاج با ریشه‌دهی بالا. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ است.

همین ژن در گیاهان دیگر هم ردیف شدند و مشخص شد که توالی ژن *AUX1* در بین گیاهان، طی تکامل حفاظت شده است.

با توجه به این که خانواده ژنی *AUX/LAX* از انتقال دهنده‌های اکسین برون شارش برای استقرار و سازماندهی سلول‌های ریشه جنینی آرابیدوپسیس هستند (Shen et al., 2010) و پژوهش‌های دیگر نشان داد که معمولاً انتقال اکسین از برگ و تجمع آن در انتهای قلمه برای ایجاد ریشه‌های نابجا در ارقام سهل‌ریشه‌زا کافی است (Costa et al., 2013) و این امر می‌تواند توسط ژن‌های ناقل اکسین نظیر *AUX1* صورت گیرد، بنابراین انتظار می‌رود این ژن در زیتون نیز به عنوان یکی از ژن‌های کاندید دخیل در ریشه‌زایی باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت تأمین هزینه‌ها (طرح پژوهشی شماره ۴۳۷) و فراهم نمودن امکانات و همچنین مؤسسه تحقیقات علوم زیستی و منابع زیستی پروجا در ایتالیا در ایتالیا سپاسگزاری می‌نمایند.

مطالعات نشان داده است که نیمه عمر پروتئین کد شده توسط ژن *AUX1* بسیار کوتاه است (Corinne et al., 2012) و احتمالاً طی ساعات اولیه پس از قلمه‌گیری بیان این ژن تغییر خواهد یافت. بر اساس مطالعات موجود اکسین می‌تواند در مراحل اولیه ایجاد پرموردیای ریشه پس از قلمه‌گیری افزایش یابد که می‌تواند بر بیان ژن‌های وابسته هم اثر بگذارد (Costa et al., 2013). به منظور درک بیشتر لازم است بیان ژن طی ساعات مختلف پس از قلمه‌گیری در نتاج با ریشه‌دهی بالا و پایین بررسی گردد، همچنین اثر اکسین خارجی بر بیان ژن *AUX1* در آزمایشی با حضور اکسین و بدون آن در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از قلمه‌گیری در حال بررسی است.

نتایج بررسی بیان این ژن‌ها در بافت‌های مختلف از جمله: برگ، گل، ریشه و انتهای قلمه در نتاج با ریشه‌دهی بالا نشان داد که بیشترین بیان ژن‌ها در ناحیه انتهای قلمه و ریشه است (شکل ۱-C و D).

تحلیل بیوانفورماتیک نشان داد که ژن *AUX1* در زیتون دارای ۸ اگزون و طول کامل ژن حدود ۴۰۰۰ جفت باز است. توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن با تشابه بالای ۸۰ درصد با توالی نوکلئوتید و پروتئین

منابع

- Corinne, A. D., Bassa, C., Mila, I., Regard, F., Zouine, M. and Bouzayen, M. (2012) Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of *Aux/IAA* gene family in tomato. *Plant Cell Physiology* 53: 1583-1595.
- Costa, C. T., Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S. and Fett-Neto, A. G. (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 4: 133.
- De Klerk, G. J., Van der Krieken, W. and De Jong, J. C. (1999) The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 35: 189-199.
- ExpASy, SIB bioinformatics Resource Portal. Retrieved from <http://www.expasy.org>. On: 30 June 2011.

- Fukaki, H. and Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology* 69(4): 437-449.
- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. (2008) *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition, Dordrecht, Netherlands.
- Johnson, L. (1957) A review of the family *Oleaceae*. *Contributions from the New South Wales National Herbarium* 2: 397-418.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25: 402-408.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. On 14 November 2013.
- Santos Macedo, E., Cardoso, H. G. and Hern'andez, A. (2009) Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction. *Physiologia Plantarum* 137: 532-552.
- Santos Macedo, E., Sircar, D., Cardoso, H. G., Peixe, A. and Arnholdt-Schmitt, B. (2012) Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europaea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. *The Plant Cell Report* 31: 1581-1590.
- Sebastiani, L. and Tognetti, R. (2004) Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs 'Frantoio' and 'Gentile di Larino') cuttings. *Scientia Horticulturae* 100: 75-82.
- Shen, C. J., Bai, Y., Wang, S., Zhang, S., Wu, Y., Chen, M., Jiang, D. and Qi, Y. (2010) Expression profile of *PIN*, *AUX/LAX* and *PGP* auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abiotic stress. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 277: 2954-2969.
- Softberry Software and Services. Retrieved from <http://linux1.softberry.com>. On 10 August 2013.
- Wu, S., Collins, G. and Sedgley, M. (2004) A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite and SCAR markers. *Genome* 47: 26-35.

Identification and gene expression analysis of *AUX1* influencing adventitious root induction in olive cuttings (*Olea europaea* L.)

Vahideh Hedayati¹, Amir Mousavi^{1*}, Fiammetta Alagna², Saverio Pandolfi²,
Khadijeh Razavi¹, Luciana Baldoni² and Seyed Mehdi Hosseini Mazinani^{1*}

¹ Department of Plant Molecular Biotechnology, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

² Institute of Biosciences and Bioresources (CNR-IBBR), Perugia, Italy

Abstract

Olive is one of the most important fruit crops throughout the Mediterranean Basin, mainly propagated by cuttings. The adventitious root development is a key stage in vegetative propagation; however the low rooting capacity of some cultivars severely affects the efficiency of olive clonal propagation. Auxin Influx Carrier gene (*AUX1*), plays a key role in lateral root formation in many plant species promoting the export of IAA from newly developing leaves to lateral root primordia. Putative olive homologues were amplified by using degenerate primers designed on the conserved regions of *AUX1* transcripts identified in other plants. Transcript and amino acid sequences in root (*OeAUX1R*) and base of cutting (*OeAUX1B*) were different causes of polymorphisms relating to possible distinct roles in these tissues. In order to investigate the gene expression patterns, Real-time PCR was performed on cuttings during the rooting stage collected from genotypes characterized by high and low rooting ability. Moreover, the gene expression was investigated on different olive tissues. Preliminary results showed that the expression of *OeAUX1B* and *OeAUX1R* in base of cuttings and roots of the high-rooting genotype were higher which suggests the hypothesis of the involvement of *OeAUX1* in olive rooting. Bioinformatics analysis revealed that *AUX1* gene had 8 exons in olive and the sequence of this gene in plant was conserved during evolution.

Key words: *Olea europaea* L., Gene expression, Olive rooting, *AUX1* gene

* Corresponding Authors: m-amir@nigeb.ac.ir, hosseini@nigeb.ac.ir

The effect of tetraploidy induction on morphology and anatomy characteristics of *Cannabis sativa* L.

Mahsa Bagheri and Hakimeh Mansouri *

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

Abstract

The production of tetraploid plant was studied in *Cannabis sativa* L. with colchicine at three different concentrations (i.e., 0.0, 0.1 and 0.2%) for about 24 and 48 h through dropping method. Flow cytometry analyses were used to confirm the ploidy level. Morphologic and anatomic characteristics between tetraploid and diploid control plants were compared. The results showed that 0.2% colchicine for 24 h had the best effect. The percentage of tetraploid plants and the survival rate were lowered by increasing the treatment time. In addition, the leaf index and height of tetraploid plants exhibited a significant decrease compared to the diploid plants. The size of leaves' epidermis stomata were larger in tetraploid plant compared to the diploid ones, in spite of their less density of stomata. However, the amount of total chlorophyll and carotenoids were almost the same in both of tetraploid and diploid plants. In addition, some differences were also observed in the cross section of stem of these plants from the descriptive structure point of view. On the whole, the results introduced usage of the stomata parameters as an effective and convenient method for detecting the tetraploid plants; however, the flow cytometry analysis was more effective in assessing the ploidy percentage.

Key words: Tetraploidy, Morphological characteristics, Flow cytometry, Colchicine, Cannabis plant

* Corresponding Author: h_mansouri@mail.uk.ac.ir

The study of physiological and biochemical responses of *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* Schreb. under drought stress

Ayoub Molaahmad Nalouisi ¹, Abdollah Hatamzadeh ¹, Mahmood Ghasemnezhad ^{1*} and Mohammad Hassan Alibiglouei ²

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

² Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

Abstract

Drought stress is a main limiting factor of turfgrass growth in arid and semi-arid regions. Therefore, in this study, the physiological and biochemical changes in two turfgrass species *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* schreb during drought stress (70-75 centibar) in a 40-day period and recovery were investigated. Control plants during drought stress were regularly irrigated at soil field capacity (20-25 centibar). The results showed that leaf relative water content and leaf chlorophyll content with long-term stress decreased. Electrolyte leakage and proline during drought stress significantly increased and in recovery stage, the level of electrolyte leakage and proline reached to the control. The activity of peroxidase and superoxide dismutase in two turfgrass significantly increased after 30 days and then significantly reduced. In *F. arundinacea* schreb the activity of ascorbat peroxidase after 20 days significantly increased and then significantly reduced. Also, in *F. arundinacea* schreb species the activity of catalase increased during drought stress and in recovery stage the activity of catalase reduced. In studied species during drought stress and recovery stage, the activity of ascorbat peroxidase and catalase significantly increased compared to the control. These results suggested that the resistant species *F. arundinacea* schreb, under drought stress had a low level of electrolyte leakage, higher level of relative water content and chlorophyll destruction was less than *A. stolonifera*.

Key words: *Agrostis stolonifera*, *Festuca arundinacea* Schreb., Antioxidant enzymes, Drought stress, Proline

* Corresponding Author: ghasemnezhad@guilan.ac.ir

Effect of cycocel on photosynthetic activity and essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under drought stress

Babak Andalibi * and Fatemeh Nouri

Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Abstract

Drought stress is one of the most important and most common environmental stresses that limit plant growth. Photosynthesis is the main determinant of plant growth and its retention ability under environmental stress condition is important for preservation of growth stability. To study the effect of spraying CCC on photosynthesis activity and essential oil content on '*Foeniculum vulgare*', an experiment was done in split plot design based on complete block with four replications in research field of University of Zanjan in 2011. Levels of drought stress included, control, soft stress (when 30% of available water was out of soil), severe stress (when 90% of available water was out of soil), and three concentration of CCC 0, 1500 and 3000 mg/L. The results showed that between rates foliar application on physiologic characteristics as photosynthesis rate, transpiration severity, RWC and ΔT intercellular (C_i), stomata conductivity, mesophyll conductivity and essential oil content was significant. By spraying 3000 mg/L CCC, balanced the plant position against drought stress and could reduce negative effect. Foliar application of CCC caused significant increase in photosynthesis rate, mesophyll conductivity and significant decrease stomata conductivity, transpiration severity under drought stress and could increase essential oil content under soft stress. In this study, foliar application of CCC to content 3000 mg/L had the highest effect on this characters.

Key words: Gas exchange, Drought stress, Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), Photosynthesis rate

* Corresponding Author: andalibi@znu.ac.ir

Effect of cultivar, cold and paclobutrazol on growth, chlorophyll content and cell membrane injury in *Phaseolus vulgaris* plantlet

Rayhaneh Amooaghaie * and Elham Shariat

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrkord, Iran

Abstract

The paclobutrazol is one of plant growth regulators from triazoles group that is able to protect plants against environmental stress conditions. This experiment was carried out to investigate paclobutrazol (0, 25 and 50 mg/L) effects on reduction of injuries caused by low temperature ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) stress in two cultivars of *Phaseolus vulgaris* [Daneshkadeh cv. (white bean) and Sayyad cv. (red bean)]. The results showed that low temperature stress, reduced fresh weight and dry matter and also reduced length of shoots and roots and leaf chlorophyll contents but increased electrolyte leakage percentage. Paclobutrazol treatment reduced fresh weight and dry matter and length of shoots but increased root dry weight and root development. Moreover, paclobutrazol-treated plants, when exposed to the cold stress condition, showed electrolyte leakage percentage less than control plants. Treatment of seedlings with paclobutrazol led to an increase in chlorophyll contents, either in stress or non stress conditions. White bean was more sensitive to cold than red bean and paclobutrazol affected white bean more than red bean. Therefore, it could be concluded that paclobutrazol treatment improved ability of plant responses to the cold stress and this effect was more remarkable in cold sensitive cultivars.

Key words: Paclobutrazol, Cold stress, Growth, Chlorophyll content, *Phaseolus vulgaris*, Electrolyte leakage

* Corresponding Author: ramooaghaie@sku.sci.ir

Effect of zinc (Zn) and auxin (IBA) foliar application on phytohormonal variation and growth of corn (*Zea mays* L.)

Behnam Zand ¹, Ali Sorooshzadeh ^{1*}, Faezeh Ghanati ² and Foad Moradi ³

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Department of Molecular Physiology, Institute of Agriculture Biotechnology, Karaj, Iran

Abstract

In order to assess corn responses to zinc compounds and auxin (Indole Butyric Acid) foliar application in shoots and roots, a pot experiment was carried out in randomized complete block design in three replications. Results showed that, zinc and auxin increased auxin and abscisic acid concentration both in shoots and roots. Also, fresh and dry weight of shoot and root increased model to foliar application, because protein synthesis was increased. On the other hand, according to unusual case, auxin and ABA showed positive parallel variation both in shoot and root, but this relation was more noticable in shoots.

Key words: Root dry weight, Root length, Shoot dry weight, Hormone ratio

* Corresponding Author: soroosh@modares.ac.ir

The effect of methyl jasmonate and different chloride concentrations on photosynthetic pigments and proline content in *Nicotiana tabacum* L. cv. Cooker 347

Mohammad Reza Tizhoosh-Jalaly¹, Jannat Sarmad^{1*}, Akbar Norastehnia¹,
Mohsen Zavareh² and Mahyar Moshtaghi³

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

² Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

³ Department of Agronomy, Rasht Tobacco Institute, Iranian Tobacco Company, Rasht, Iran

Abstract

Jasmonic acid and its methylated ester (methyl jasmonate), as natural plant growth regulators, are widely found in plants. In this study, the effect of methyl jasmonate (30 μ M), in the early stages of *Nicotiana tabacum* L. cv. Cooker 347 growth, on photosynthetic pigments and proline was studied at high concentration of chloride. This experiment was performed in randomized complete block design with 4 replications, during 2011 crop year at Guilan Tobacco Research Center, outside greenhouse and under pot conditions. After transplanting similar seedlings to pots in rapid growth phase, the plants were irrigated with three levels chloride (50, 150 and 300 mg/L) as CaCl₂ both in presence and absence of methyl jasmonate for 4 weeks. Data analysis showed that by increasing Cl⁻ concentrations up to 300 (mg/L), chloride and calcium accumulation of leaves increased, whilst photosynthetic pigments and proline decreased. Exogenous application of methyl jasmonate (30 μ M) significantly increased photosynthetic pigments in all treatments and proline in the 300 mg/L treatment. It seemed that the application of external methyl jasmonate (30 μ M) could improve tobacco plant injuries at high chloride concentration.

Key words: Proline, Tobacco, Photosynthetic pigments, Methyl jasmonate, Chloride

* Corresponding Author: sarmad@guilan.ac.ir

***In vitro* regeneration of some Iranian alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes via somatic embryogenesis**

**Sohrab Abedi¹, Nasser Zare^{1*}, Rasoul Asghari Zakaria¹,
Parisa Sheikhzadeh Mosaddegh¹ and Majid Shokrpour²**

¹ Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Department of Horticulture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

An effective *in vitro* regeneration system is one of the prerequisites for genetic manipulation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties and genotypes. In this research, somatic embryogenesis of four alfalfa genotypes, 6-18 (synthetic), 4-14 (Kara Yonje- Karakozlu), 3-27 (Kara Yonje Maraghe) and y-6 (Regen-SY), were investigated using leaf and petiole explants. Formation of callus and somatic embryogenesis was significantly influenced by the explant type and interaction of genotype and culture medium. Petiole explants of genotype 4-14 produced the highest yield of callus (0.406 gr fresh weight of callus). Percentage of somatic embryogenesis and the number of embryos per callus in petiole explants of genotype 4-14 was higher than those of other genotypes and explants. In genotype 6-18, the highest percentage of somatic embryogenesis was achieved on MS medium containing 5 mg/L 2,4-D and 2 mg/L kinetin. There was no significant differences between genotypes and explants in terms of embryo conversion to plantlet, and on average, 58% of somatic embryos converted to plantlet on MS medium. The petiole explants of genotype 6-18 did not exhibit somatic embryogenesis response in medium containing low ratio of 2,4-D:Kinetin (5 mg/L 2,4-D and 2 mg/L kinetin). While, these explants showed somatic embryogenesis in higher ratio of 2,4-D:Kinetin (5:1). The plantlet conversion efficiency of somatic embryos produced through this study was relatively higher and therefore, the method presented in this study could be used in alfalfa genetic manipulation and molecular studies.

Key words: Somatic embryogenesis, *In vitro* regeneration, Alfalfa, *Medicago sativa* L.

* Corresponding Author: nzare@uma.ac.ir

Effect of water deficit on morphological and physiological parameters of *Carum copticum*

Roya Razavizadeh ^{1*}, Mahdiah Shafeghat ¹ and Shahla Najafi ²

¹ Department of Biology, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

Abstract

Ajwan (*Carum Copticum* L.) is an important plant in Apiaceae family and has many medical uses. In this research, the effects of water deficit stress on growth, yield, compatible metabolite accumulations (proline and carbohydrates) and plant ingredients were studied under controlled conditions in a greenhouse. Water deficit levels included mild stress (90% field capacity), medium stress (70% field capacity) and severe stress (50% field capacity). In 50% field capacity, the plant didn't reach to seeding stage. Also, In this study, seed essence of plants under water stress, levels of 70 and 90% field capacity, was obtained by distillation with water and chemical compounds of essence were analyzed by GC/MS method. The statistical results showed significant effects of water stress on growth parameters, seed yield, proline accumulation, carbohydrate accumulation, oil yield and essential oil percentage. The increase of water stress decreased plant height, number of lateral branches, dry weight and seed yield. However, oil yield, oil percentage, proline and carbohydrate contents increased. The highest amounts of proline and carbohydrate at the 50% of field capacity (high stress) and also the maximum essential oil yield and percentage of essential oil at 70% field capacity were observed. Twenty-one chemical compounds were identified in both of the essences of *Carum Copticum*, and thymol, gamatherpinen and parasimen in each treatment were changed.

Key words: Essence, Water deficit stress, Thymol, Proline, *Carum copticum*, Carbohydrate

* Corresponding Author: razavi.roya@gmail.com

A study on organogenesis in *Lycopersicon esculentum* Mill.

Seyed Mohammadali Khajeddini ¹, Somayeh Naghiloo ²
and Mohammad Reza Dadpour ^{3*}

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Miyaneh Branch, Miyaneh, Iran

² Department of Plant Sciences, College of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most important horticultural crops, belonging to the family Solanaceae. Owing to the significance of tomato as a model plant in genetic studies, little is known about the floral development in this plant. The organogenesis of tomato flowers was studied using epi-illumination light microscopy. The flowers were pentamerous with the acropetal and asynchronous inception of floral whorls. The initiation of sepals, petals and stamens followed helically, unidirectionally and bidirectionally, respectively. The high occurrence of floral abnormalities was remarkable. The initiation of a higher number of organ primordia was observed for sepals, petals, stamens and carpels. The increase in the number of organs resulted from the duplication of organ primordia, especially for the stamen whorl. Based on previous studies, low temperature was probably responsible for the abnormal development of tomato flowers.

Key words: Organogenesis, *Lycopersicon esculentum*, Epi-illumination light microscopy, Abnormal development

* Corresponding Author: dadpour@tabrizu.ac.ir

Correlation between antioxidant activities and phenolic content of *Leontice armeniaca* and *L. leontopetalum*

Samira Shokatyari and Rashid Jamei *

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

Abstract

In this study, the total phenol and flavonoid contents and antioxidant activities of dried leaves and fresh and dried tubers of *Leontice armeniaca* and *L. leontopetalum* were determined using ferric reducing antioxidant power (FRAP), reducing power and superoxide radical scavenging percentage. The results revealed that in both species, the content of total phenolic, total flavonoid and FRAP of leaf were greater than tuber. The order of total phenolic and total flavonoid contents and FRAP of *leontopetalum* was significantly higher than *armeniaca* ($P < 0.05$). The highest reducing power was found in leaves of *L. leontopetalum* and the lowest was found in its tubers. Free radical superoxide scavenging activity in leaves and tubers of *L. armeniaca* were higher than *L. leontopetalum*. The dried tubers of both species had higher phenolic content, FRAP, reducing power and superoxide radical scavenging activity than fresh tubers. The high positive correlations were observed between total phenol and flavonoid content / FRAP and reducing power. But, this compound did not show any significant correlation with superoxide radical scavenging activity. The increase of total phenolic content affected the FRAP and reducing power values, however, there was no effect on superoxide radical scavenging activity. This meant that phenolic compounds played a key role in antioxidant capacity and reducing power in the two species, while its superoxide radical scavenging was not only attribute to phenolic compound. So drying could be an effective method for increasing phenolic compound and antioxidant capacity. Also results obtained from this study showed that *Leontice* could be a source of natural antioxidant.

Key words: Antioxidant activity, Flavonoid, Phenol, *leontice*

* Corresponding Author: r.jamei@urmia.ac.ir

Iranian Journal of Plant Biology

6th Year, No. 22, Winter 2014

ISSN (Print): 2008-8264

ISSN (Online): 2322-2204

Contents

- **The study of physiological and biochemical responses of *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* Schreb. under drought stress 9**
Ayoub Molaahmad Nalouei, Abdollah Hatamzadeh, Mahmood Ghasemnezhad and Mohammad Hassan Alibiglouei

- **The effect of tetraploidy induction on morphology and anatomy characteristics of *Cannabis sativa* L. 10**
Mahsa Bagheri and Hakimeh Mansouri

- **Identification and gene expression analysis of *AUX1* influencing adventitious root induction in olive cuttings (*Olea europaea* L.) 11**
Vahideh Hedayati, Amir Mousavi, Fiammetta Alagna, Saverio Pandolfi, Khadijeh Razavi, Luciana Baldoni and Seyed Mehdi Hosseini Mazinani

Iranian Journal of Plant Biology

6th Year, No. 22, Winter 2014

ISSN (Print): 2008-8264

ISSN (Online): 2322-2204

Contents

- **Correlation between antioxidant activities and phenolic content of *Leontice armeniaca* and *L. leontopetalum*** 1
Samira Shokatyari and Rashid Jamei

- **A study on organogenesis in *Lycopersicon esculentum* Mill.** 2
Seyed Mohammadali Khajeddini, Somayeh Naghiloo and Mohammad Reza Dadpour

- **Effect of water deficit on morphological and physiological parameters of *Carum copticum*** 3
Roya Razavizadeh, Mahdieh Shafeghat and Shahla Najafi

- ***In vitro* regeneration of some Iranian alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes via somatic embryogenesis** 4
Sohrab Abedi, Nasser Zare, Rasoul Asghari Zakaria, Parisa Sheikhzadeh Mosaddegh and Majid Shokrpour

- **The effect of methyl jasmonate and different chloride concentrations on photosynthetic pigments and proline content in *Nicotiana tabacum* L. cv. Cooker 347** 5
Mohammad Reza Tizhoosh-Jalaly, Jannat Sarmad, Akbar Norastehnia, Mohsen Zavareh and Mahyar Moshtaghi

- **Effect of zinc (Zn) and auxin (IBA) foliar application on phytohormonal variation and growth of corn (*Zea mays* L.)** 6
Behnam Zand, Ali Sorooshzadeh, Faezeh Ghanati and Foad Moradi

- **Effect of cultivar, cold and paclobutrazol on growth, chlorophyll content and cell membrane injury in *Phaseolus vulgaris* plantlet** 7
Rayhaneh Amooaghaie and Elham Shariat

- **Effect of cycocel on photosynthetic activity and essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under drought stress** 8
Babak Andalibi and Fatemeh Nouri

Referees committee (6th Year, No. 22, Winter 2014)

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 Iranian Journal of Plant Biology:

Dr. Babak Andalibi	University of Zanjan
Dr. Mohammad Bagher Bagherieh-Najjar	Golestan University
Dr. Mehri Behnamnia	Damghan University
Dr. Nader Chaparzadeh	Azarbaijan Shahid Madani University
Dr. Ali Akbar Ehsanpour	University of Isfahan
Dr. Alireza Einali	University of Sistan and Blouchestan
Dr. Yahya Emam	University of Shiraz
Dr. Sedigheh Esmailzadeh Bahabadi	University of Zabol
Dr. Faezeh Ghanati	Tarbiat Modares University
Dr. Mojtaba Jafarinia	Islamic Azad University, Fars Science and Research Branch
Dr. Mohammad Kafi	Ferdowsi University of Mashhad
Dr. Batoul Keramat	Shahid Bahonar University of Kerman
Dr. Maryam Keshavarzi	Alzahra University
Dr. Khadijeh Kiarostami	Alzahra University
Dr. Maryam Madadkar Haghjou	Lorestan University
Dr. Hakimeh Oloumi	Shahid Bahonar University of Kerman
Dr. Heshmat Omid	Shahed University
Dr. Homa Rajaei	University of Shiraz
Dr. Roya Razavizadeh	Payame Noor University
Dr. Mohammad Jamal Saharkhiz	University of Shiraz
Dr. Leila Shabani	Shahrekord University
Dr. Elahe Vatankhah	University of Zanjan
Dr. Parzhak Zoufan	Shahid Chamran University of Ahvaz

Iranian Journal of Plant Biology (Scientific Research Journal)
6th Year, No. 22, Winter 2014

ISSN (Print): 2008-8264

ISSN (Online): 2322-2204

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)

Scientific Editor and Professional Layout Designer: Fariba Hadian (M.Sc)

Publisher: University of Isfahan

Address: Iranian Journal of Plant Biology Office, Technology and Research Department, University of Isfahan, Hezar Jerib Street, Postal Code 81746-73441, Isfahan, Islamic Republic of Iran.

Email: IJPB@ui.ac.ir

Website: <http://uijs.ui.ac.ir/ijpb>

Tel: +98(31)37934255

Fax: +98(31)37932177

Iranian 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** for Print and **ISSN: 2322-2204** for Online 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.

Iranian Journal of Plant Biology is indexed and listed in these Databases:

IJPB electronic database	http://uijs.ui.ac.ir/ijpb
EBSCOhost databases	http://www.ebscohost.com
DOAJ: Directory of Open Access Journals	http://www.doaj.org
Index Copernicus (IC Journal Master List)	http://journals.indexcopernicus.com
ISC: Islamic World Science Citation center	http://www.isc.gov.ir
Magiran: Journals database	http://www.magiran.com
SID: Scientific Information Database	http://www.sid.ir
Ulrichsweb: global serials directory	http://ulrichsweb.serialssolutions.com
Google Scholar	http://scholar.google.com/citations?hl=en&user=VKeuzPkAAAAJ

Publication and Lithography: University of Isfahan Publications

Publisher: University of Isfahan

Published: Spring 2015

Iranian Journal of Plant Biology

6th Year, No. 22, Winter 2014

**Published by
University of Isfahan Research Center**