

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

پیشینہ سائنس  
علمی - پژوهشی

سال ہفتم - شماره بیست و ششم - زمستان ۱۳۹۴

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 است.

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

متن کامل نشریه در پایگاه‌های اطلاع‌رسانی زیر نمایه می‌شود:

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

---

چاپ و لیتوگرافی: انتشارات دانشگاه اصفهان

ناشر: دانشگاه اصفهان

چاپ: بهار ۱۳۹۵

نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران (علمی-پژوهشی)  
سال هفتم - شماره بیست و ششم - زمستان ۱۳۹۴  
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 و سردبیر:** 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

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

**ویراستار انگلیسی:** دکتر کاظم نگارش

**ویراستار و صفحه‌آرای تخصصی:** فریبا هادیان

**ناشر:** دانشگاه اصفهان

**نشانی:** اصفهان - خیابان هزار جریب - دانشگاه اصفهان - ساختمان کتابخانه مرکزی - معاونت پژوهش و فناوری -

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:** ۳۷۹۳۴۲۵۵ (۳۱) ۹۸+

**شماره دورنگار:** ۳۷۹۳۲۱۷۷ (۳۱) ۹۸+

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، نبایستی 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 مسؤول (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 مسؤول: 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 برچسب 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 فلورستیک 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 ۰/۵ 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. 5<sup>th</sup> 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 Einhellung, 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  $\beta$ -Carotene in high purity. US Patent 6057484.

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

به ترتیب شامل: نام نویسنده، 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. 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 33<sup>rd</sup> 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](mailto: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



معرفی داوران این شماره (سال هفتم - شماره بیست و ششم - زمستان ۱۳۹۴)

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 گلستان	دکتر محمدباقر باقریه نجار
دانشگاه ارومیه	دکتر لطیفه پورا کبر
دانشگاه خوارزمی	دکتر پریسا جنوبی
دانشگاه پیام نور	دکتر رؤیا رضوی زاده
دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان	دکتر منیره رنجبر
دانشگاه گیلان	دکتر جنت سرمد
دانشگاه شهرکرد	دکتر لیلا شبانی
دانشگاه قم	دکتر رضا شیخ اکبری مهر
دانشگاه شهرکرد	دکتر ریحانه عموآقایی
پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی	دکتر مجید قربانی نهوجی
پژوهشگر	دکتر علی اکبر قطبی راوندی
دانشگاه تربیت مدرس	دکتر فائزه قناتی
دانشگاه تربیت مدرس	دکتر شاهرخ کاظم پور اصلو



نشریه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی ایران  
سال هفتم - شماره بیست و ششم - زمستان ۱۳۹۴  
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه چاپی): ۸۲۶۴-۲۰۰۸  
شماره استاندارد بین‌المللی (نسخه الکترونیک): ۲۲۰۴-۲۳۲۲

## فهرست مقالات

- تغییر در ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونالیاز و تیروزین آمونالیاز توسط پیش‌تیمار اتانول آمین در گیاه *Nicotiana rustica* تحت شرایط تنش شوری کشت در شیشه ..... ۱-۱۲  
سمیه رجاییان، علی اکبر احسانپور و محمد امین طغیانی
- روند تکامل صفات ریخت‌شناسی گونه‌های *Astragalus dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* بر اساس تبارزایی داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matK* ..... ۱۳-۲۶  
فرحناز جوانمردی
- القای پاسخ‌های دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی کتان سفید (*Linum album*) توسط امواج فراصوت ..... ۲۷-۴۰  
ارمغان عابدزاده نیشابوری و آیت‌اله رضایی
- بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های آویشن (*Thymus vulgaris*) تحت تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه ..... ۴۱-۵۸  
رؤیا رضوی‌زاده و نسیم محققیان
- اثر سیلیکون و نانوسیلیکون در کاهش صدمات ناشی از تنش شوری بر گیاهچه ذرت ..... ۵۹-۷۴  
حمیدرضا زارع، زهره قنبرزاده، آسیه بهداد و ساسان محسن‌زاده
- ارتقای تحمل و بهبود وضعیت بذر یونجه (*Medicago sativa*) در شرایط تنش شوری تحت تأثیر زمان‌های متفاوت پرایمینگ با  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$  ..... ۷۵-۹۶  
کیومرث آرمن‌تراب، مریم مددکار حق‌جو و احمد اسماعیلی



## تغییر در ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیاز و تیروزین آمونیاز توسط پیش تیمار اتانول آمین در گیاه *Nicotiana rustica* تحت شرایط تنش شوری کشت در شیشه

سمیه رجاییان، علی اکبر احسانپور\* و محمد امین طغیانی  
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

تنش شوری یکی از مهم‌ترین عواملی است که رشد و تولید گیاه را در سراسر جهان به مخاطره می‌اندازد. بدیهی است که کارگیری ترکیباتی که مقاومت به شوری را در گیاهان افزایش می‌دهد از اهمیت زیادی در کاهش ضررهای اقتصادی ناشی از این تنش برخوردار است. یکی از این ترکیبات، اتانول آمین است و هدف از مطالعه حاضر درک بیشتر چگونگی عملکرد این ترکیب در ایجاد مقاومت به تنش شوری است. بدین منظور، گیاهچه‌های چهار هفته‌ای *Nicotiana rustica* که در محیط MS رشد یافته بودند ابتدا به مدت دو روز با اتانول آمین (۰، ۷۰، ۱۳۰، ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرومولار) پیش تیمار شد، سپس به محیط کشت MS حاوی غلظت بهینه شده (۲۰۰ میلی‌مولار) نمک سدیم کلرید منتقل شدند. پس از سه هفته نتایج نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید، فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز کاهش و مقدار آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم تیروزین آمونیاز افزایش یافته است. در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که پیش تیمار اتانول آمین موجب تغییر در محتوای ترکیبات فنلی از جمله افزایش آنتوسیانین‌ها شده است و می‌توان چنین استنباط نمود که این تغییرات احتمالاً راهکاری برای مقابله با تنش شوری به شمار می‌رود.

**واژه‌های کلیدی:** *Nicotiana rustica*، اتانول آمین، فنل، تیروزین آمونیاز، فنیل آلانین آمونیاز، تنش شوری

### مقدمه

می‌شود و باعث کاهش قابلیت دسترسی به آب، تجمع یون سدیم و عدم توازن یونی شده، به مهار رشد گیاه و در نهایت به آسیب سلولی و مولکولی گیاه منجر

تنش شوری به عنوان عامل اصلی محدود کننده نمو و محصول دهی گیاه به ویژه گیاهان زراعی قلمداد

\* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ehsanpou@sci.ui.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۳۷۹۳۴۱۵۰

خواهد شد. فعالیت TAL در بین گیاهان دو لپه به خوبی شناخته نشده است با وجود این، Beudoin-Eagan و Thorpe در سال ۱۹۸۵ فعالیت این آنزیم را طی القای نوساقه از کالوس تنباکو به وضوح نشان دادند. همچنین آنها تفاوت فعالیت آنزیم TAL و PAL را در گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum*) اثبات نمودند.

در گیاهان چندین آمین بیوژنیک مهم وجود دارد که از نظر ریخت‌زایی و تنش-فیزیولوژی دارای اهمیت هستند. اتانول آمین یکی از این ترکیبات است که در جنین‌زایی، رشد و نمو اندام‌ها و تشکیل غشاهای درون سلولی نقش مهمی ایفا می‌نماید (Mascher *et al.*, 2005a). به خوبی مشخص شده است هنگامی که گیاه در معرض تنش (مانند خشکی، شوری، فلزات سنگین، پاراکوات و نظایر آن) قرار می‌گیرد غشاهای زیستی سلول آسیب می‌بیند و در نتیجه فسفولیپیدهای غشا شکسته شده و اتانول آمین از آنها آزاد می‌شود. افزایش سطح آمین‌ها به علت قرار گرفتن در معرض تنش واکنش هشدار دهنده‌ای را القا می‌نماید تا سازوکارهای مقابله با تنش فعال شوند. پیشنهاد شده است که اتانول آمین با منشأ خارجی می‌تواند نقش سیگنالی برای راه‌اندازی مقاومت به تنش و نیز پایدارکننده غشا داشته باشد (Mascher *et al.*, 2005a). در آلمان غربی مطالعات متعددی در مزرعه با شرایط اقلیمی و در خاک‌های مختلف روی اثر اتانول آمین بر میزان کیفیت محصول جو، گندم، جو دوسر و سیب‌زمینی انجام گرفته است. نتایج این مطالعات نشان داد که در شرایط تنش محیطی میزان محصول تا ۲۰ درصد افزایش می‌یابد (Mascher *et al.*, 2005a). همچنین، Rajaeian و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که در گیاه ذرت تحت تنش پاراکوات افزایش فعالیت

می‌شود (Silva-Ortega *et al.*, 2008). مقاومت به شوری در گیاه صفتی پیچیده است و سازوکارهای بسیاری را در بر می‌گیرد که درک آنها برای ایجاد راهکارهای مناسب جهت مهندسی ژنتیک گیاهان زراعی مفید خواهد بود. ثابت شده است که تنش‌های محیطی به کاهش یا افزایش مقدار ترکیبات فنلی که گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند، منجر می‌شود (Król *et al.*, 2014). این ترکیبات می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را خنثی نموده، با فلزاتی که واکنش‌های اکسیژناسیون را کاتالیز می‌کنند ترکیباتی را تشکیل دهند و از فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده جلوگیری نمایند. فنل‌ها گروه بزرگی از ترکیبات را تشکیل می‌دهند که می‌توان آنها را به پنج زیرگروه شامل: کومارین‌ها، لیگنین‌ها، فلاونوئیدها، فنولیک اسیدها و تانن‌ها تقسیم‌بندی نمود (Gumul *et al.*, 2007). فلاونوئیدها فراوان‌ترین ترکیب از پلی‌فنل‌ها در رژیم غذایی انسان است که ساختار پایه‌ای آنها از هسته فلاون با ۱۵ اتم کربن که در سه حلقه نظم یافته‌اند، تشکیل شده است (Dai and Mumper, 2010). آنتوسیانین‌ها در فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها شرکت می‌کنند و به گسترده‌گی در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند (Lapidot *et al.*, 1999). در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی، دو آنزیم: فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و تیروزین آمونیا لیاز (TAL) جزو مهم‌ترین آنزیم‌ها شناخته می‌شوند (Beudoin-Eagan and Thorpe, 1985) و Hoagland و Duke (۱۹۸۱) گزارش دادند که این آنزیم‌ها از طریق دامیناسیون فنیل آلانین و تیروزین به ترتیب برای تولید t-سینامیک اسید و P-کوماریک اسید و با آزاد کردن آمونیوم عمل می‌کنند و از این طریق پیش‌ساز ترکیبات فنلی تولید

پس از چهار هفته به محیط کشت حاوی گیاهچه‌های رشد یافته محلول اتانول آمین افزوده شد به نحوی که غلظت‌های صفر، ۷۰، ۱۳۰، ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرومولار اتانول آمین حاصل شد. این گیاهچه‌ها پس از دو روز به محیط کشت بهینه شده با غلظت نمک (NaCl) یعنی ۲۰۰ میلی‌مولار منتقل شدند. کلیه کشت‌ها در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با اختلاف ۱ تا ۲ درجه، فتوپریود نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور حدود ۳۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه رشد داده شدند. پس از ۳ هفته میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید (MDA): میزان

پراکسیداسیون لیپیدهای سلول با اندازه‌گیری MDA تعیین شد. تقریباً ۱ گرم برگ تازه گیاه در محلول ۱۰ درصد حجمی TCA (تری کلرو استیک اسید) همگن و به مدت ۲۰ دقیقه با نیروی ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی ۱ میلی‌لیتر از محلول تیوباربتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد در TCA ۲۰ درصد افزوده شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت، سپس به سرعت روی یخ سرد گردید. جذب این محلول پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. غلظت MDA بر اساس روش Health و Packer (۱۹۶۸) با ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه گردید.

#### اندازه‌گیری فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید با

روش رنگ‌سنجی با استفاده از کلرید آلومینیوم صورت

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در پاسخ به پیش‌تیمار اتانول آمین به سمیت‌زدایی بهتر ROS منجر می‌گردد. در مطالعه‌ای دیگر، Rajaeian و Ehsanpour (۲۰۱۵) نشان دادند که در گیاه تنباکو پیش‌تیمار شده با اتانول آمین که در معرض تنش شوری قرار داشت، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و نیز مقدار کاروتنوئید همگی به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه منجر شد. همان‌طور که گفته شد اگر چه اثر مثبت اتانول آمین بر افزایش مقاومت در برابر برخی تنش‌ها پیش از این گزارش شده است، با وجود این، دامنه اطلاعات در این زمینه بسیار محدود است و هدف از پژوهش حاضر نیز مطالعه اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر برخی از ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL به عنوان مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستز این ترکیبات در شرایط کشت در شیشه است. داده‌های پژوهش حاضر می‌تواند در درک بهتر نحوه عملکرد اتانول آمین در گیاه برای مقابله با تنش شوری از طریق تغییرات مسیر ترکیبات فنلی دارای اهمیت باشد.

#### مواد و روش‌ها

بذر گیاه تنباکو (*Nicotiana rustica*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا بذرها به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد حجمی، سپس به مدت ۳ دقیقه با محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و در پایان، با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شدند. در مرحله بعد، بذرها استریل روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت شدند.

کلریدریک اسید نرمال متوقف شد (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985).

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL:** ۱۰۰ میلی گرم بافت تازه برگ با ۲ میلی لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی مولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸/۵) حاوی ۱۵ میلی مولار بتا-مرکاپتو اتانول همگن شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با نیروی ۴۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. در نهایت، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL از محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. برای تخمین فعالیت آنزیم ۱ میلی لیتر محلول واکنش شامل بافر واکنش (۵۰۰ میکرومولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸) حاوی ۶ میکرومول فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۱ میلی لیتر تهیه شد. سپس، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در نهایت، به این محلول مقدار ۵۰ میکرولیتر کلریدریک اسید با غلظت ۵ نرمال اضافه شد تا واکنش تولید سینامیک اسید از فنیل آلانین متوقف شود. در پایان، فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس میزان تولید سینامیک اسید بر حسب نانومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین گزارش گردید (Beaudoin-Eagan and Thorpe, 1985).

**اندازه‌گیری فنل کل:** برای اندازه‌گیری فنل کل، ۵۰۰ میلی گرم پودر خشک ساییده شده برگ در یک لوله آزمایش ریخته و ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به آن افزوده شد، سپس سوسپانسیون حاصل به آرامی مخلوط شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه سونیکیت و به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ شد. عصاره‌گیری از مواد گیاهی دو بار انجام شد. میزان فنل کل عصاره با استفاده از فولین-سیوکالتیو

گرفت (Chang *et al.*, 2002). ۰/۵ میلی لیتر از عصاره گیاهی (۱ گرم بافت برگ در ۱۰ میلی لیتر متانول) با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم، ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۱ مولار استات پتاسیم و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن، جذب آن در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

**اندازه‌گیری آنتوسیانین‌ها:** ابتدا از برگ‌های تنباکو عصاره متانولی تهیه شد (نسبت ۹۹ به ۱ متانول و کلریدریک اسید در ۴ درجه سانتیگراد). سپس، جذب نمونه‌ها در ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر خوانده و میزان آنتوسیانین‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد (Laby *et al.*, 2000).  
رابطه ۱:

حجم عصاره (میلی لیتر) × (0.25 × OD 530 - 0.25 × OD 657) واحد نسبی آنتوسیانین بر گرم وزن تر بافت (وزن بافت (گرم))

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم TAL:** حدود ۱ گرم بافت تازه برگ تنباکو در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۳ میلی لیتر بافر تریس (۰/۰۵ مولار تریس-کلریدریک اسید با اسیدیته ۸/۴) حاوی ۱۵ میلی مولار ۲-مرکاپتو اتانول به صورت همگن در آمد. میزان پروتئین عصاره با استفاده از کوماسی بلو با روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم TAL با تشکیل p-coumarate توسط اسپکتروفتومتر (مدل UV-160A، شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۳۳۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل: ۵/۵ میکرومولار L-تیروزین، ۵۰۰ میکرومولار بافر تریس با اسیدیته برابر ۸/۱ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی برگ در حجم نهایی ۱ میلی لیتر بود. پس از ۷۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد واکنش تبدیل تیروزین به کوماریک اسید با اضافه نمودن ۰/۰۵ میلی لیتر ۵



در گیاه بدون پیش تیمار اتانول آمین، تنش شوری به افزایش مقدار فلاونوئید منجر می‌شود (شکل ۲).

#### اثر اتانول آمین بر میزان آنتوسیانین‌ها: تغییرات

مقدار آنتوسیانین‌ها در برگ‌های تنباکو که تحت تنش شوری و پیش تیمار با اتانول آمین قرار داشتند در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که مقدار آنتوسیانین‌ها در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش تیمار شده‌اند به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان تحت تنش شوری است که با اتانول آمین پیش تیمار نشده‌اند، این افزایش به ویژه در غلظت ۲۷۰ میکرومولار اتانول آمین به طور چشمگیری قابل مشاهده بود. همچنین، مشاهده گردید که مقدار آنتوسیانین‌ها در گیاهان بدون پیش تیمار با اتانول آمین با قرار گرفتن در معرض تنش شوری افزایش یافت. نتایج همچنین نشان می‌دهد که مقدار آنتوسیانین‌ها گیاهان شاهد (گیاهان بدون تنش شوری) که با اتانول آمین (در همه غلظت‌های به کار برده شده ۷۰، ۱۳۰، ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرومولار) پیش تیمار شده‌اند، در مقایسه با گیاهان شاهد بدون پیش تیمار با اتانول آمین افزایش داشته است.

#### اثر اتانول آمین بر فعالیت آنزیم PAL: نتایج

حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL (شکل ۵) نشان داد که در گیاه تنباکو بدون تیمار نمک، پیش تیمار با اتانول آمین تغییر معنی‌داری از نظر فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد. در حالی که اعمال پیش تیمار اتانول آمین در حضور تنش نمک (۲۰۰ میلی‌مولار) در غلظت‌های ۲۷۰ و ۵۳۰ میکرو مولار اتانول آمین نسبت به گیاه بدون پیش تیمار کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم PAL را به همراه داشت. همچنین، نتایج نشانگر افزایش فعالیت این آنزیم در گیاه تحت تنش شوری در مقایسه

اندازه‌گیری شد (Singleton et al., 1999). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیو-کالتیو و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن افزوده شد. محتویات لوله آزمایش مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد، سپس جذب عصاره در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. محتوای فنل کل به صورت هم ارزهای تانیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نشان داده شد.

#### تحلیل آماری: کلیه آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار

انجام و داده‌ها با آزمون Two-way ANOVA تحلیل و میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  مقایسه شد.

## نتایج

#### اثر اتانول آمین بر میزان مالون‌دی‌آلدهید

(MDA): در پژوهش حاضر، تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار نمک) موجب افزایش میزان MDA بدون پیش تیمار با اتانول آمین در گیاه تنباکو داد (شکل ۱). در مقابل، کاهش میزان MDA بر اثر پیش تیمار با اتانول آمین در گیاه تحت تنش شوری مشاهده گردید. نتایج همچنین نشانگر افزایش میزان MDA در گیاه شاهد (بدون تنش شوری) در اثر پیش تیمار با اتانول آمین بود.

#### اثر اتانول آمین بر میزان فلاونوئید: نتایج نشان

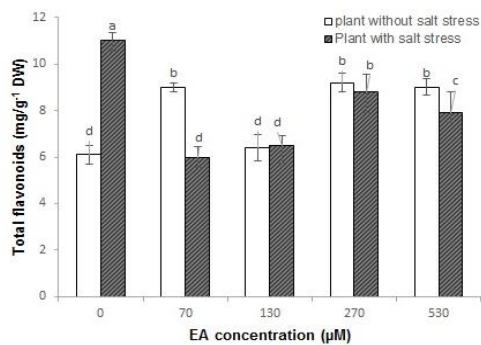
داد که پیش تیمار با اتانول آمین، مقدار فلاونوئید کل را در گیاهان تیمار شده با نمک کاهش می‌دهد، در حالی که در گیاه بدون تیمار نمک، اتانول آمین مقدار فلاونوئید کل را در تمام غلظت‌های اتانول آمین به غیر از ۱۳۰ میکرومولار افزایش داد. نتایج همچنین نشان داد که

با گیاه شاهد است.

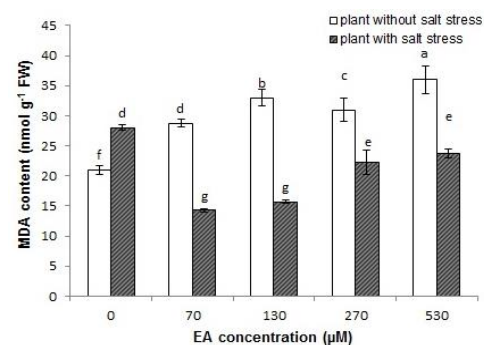
### اثر اتانول آمین بر فعالیت آنزیم TAL: سنجش

فعالیت TAL نشان داد که پیش تیمار با اتانول آمین (در همه غلظت‌های به کار برده شده) به افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان تحت تنش شوری منجر می‌شود. همان طور که شکل ۶ نشان می‌دهد در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش تیمار شده‌اند میزان فعالیت آنزیم TAL در مقایسه با گیاهان تحت تنش

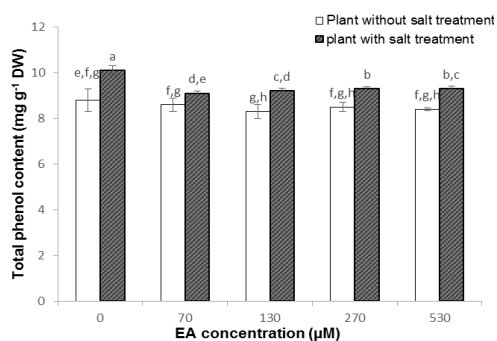
شوری که با اتانول آمین پیش تیمار نشده‌اند به طور معنی‌داری بیشتر است. نتایج همچنین نشان داد که در گیاهان شاهد (گیاهان بدون تیمار نمک) اتانول آمین در همه غلظت‌های به کار برده شده به غیر از غلظت ۲۷۰ میکرومولار، تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم TAL نداشته است. شکل ۶ همچنین نشان می‌دهد که در گیاهان بدون پیش تیمار با اتانول آمین میزان فعالیت آنزیم TAL تحت تأثیر تنش شوری، افزایش نشان داد.



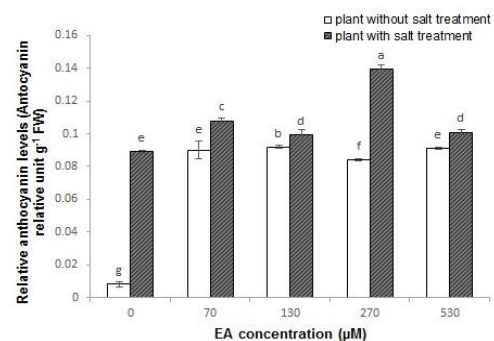
شکل ۲- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان فلاونوئید کل در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



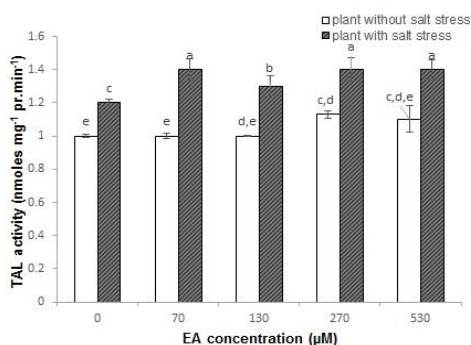
شکل ۱- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان MDA در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



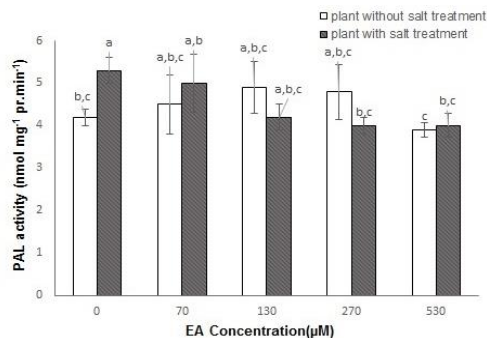
شکل ۴- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان فنل کل در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳- اثر پیش تیمار اتانول آمین بر میزان آنتوسیانین‌ها در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۶- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر فعالیت آنزیم TAL در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۳ انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵- اثر پیش‌تیمار اتانول آمین بر فعالیت آنزیم PAL در گیاه تنباکو تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین  $\pm$  تکرار ۳ انحراف معیار است. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها بر اساس آزمون دانکن است ( $P < 0.05$ ).

(Rajaeian and Ehsanpour, 2015). این مشاهدات نشان دهنده این است که اتانول آمین به عنوان نوعی عامل تنش‌زای خفیف در گیاه عمل می‌نماید. گزارش‌های دیگری نیز ویژگی القای تنش توسط اتانول آمین در گیاه شاهد را مورد توجه قرار داده‌اند (Mascher, 2005 a,b). از آنجا که تجمع اتانول آمین تحت شرایط عادی در گیاه رخ نمی‌دهد هنگامی که این ترکیب به صورت خارجی (exogene) استفاده می‌شود، می‌تواند به تجمع غیرمعمول آن در فضای خارج سلولی منجر شود، بنابراین این مقدار اضافی اتانول آمین می‌تواند سیگنال هشداردهنده‌ای برای سلول‌های گیاه باشد (Mascher, 2005b). از سوی دیگر، نتایج ما نشان داد که پیش‌تیمار گیاه با اتانول آمین در راستای نقش حفاظتی خود با کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، میزان این ترکیب (MDA) را در گیاه تحت تنش شوری کاهش می‌دهد. این نتیجه در راستای نتایج مطالعات پیشین در این زمینه بوده (Rajaeian et al., 2011؛ Mascher, 2005 a,b) و تأییدی بر تأثیر مثبت اتانول آمین به عنوان یک

## بحث

نتایج پژوهش حاضر در زمینه گروهی از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی به نام ترکیبات فنلی و آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آنها به روشنی نشان می‌دهد که پیش‌تیمار اتانول آمین در گیاه *Nicotiana rustica* پاسخ این گیاه در مقابل تنش شوری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر، ابتدا میزان MDA که شاخصی از آسیب اکسیداتیو ناشی از اعمال تنش است (Kunert and Ederer, 1985) ارزیابی شد و مطابق انتظار، نتایج نشان داد که تنش شوری میزان MDA را در گیاه افزایش می‌دهد. مشابه با نتایج حاضر، Hong و همکاران (۲۰۰۰) نیز افزایش میزان MDA در گیاه تحت تنش شوری را نشان دادند. پژوهش حاضر همچنین نشان داد که در گیاه شاهد (گیاهی که تحت تنش شوری قرار ندارد) میزان MDA توسط پیش‌تیمار با اتانول آمین افزایش می‌یابد. مطالعه قبلی ما نیز نتایج مشابهی را در گیاه ذرت نشان داد (Rajaeian et al., 2011). همچنین مشاهده شد که میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در گیاه شاهد با پیش‌تیمار با اتانول آمین افزایش می‌یابد

نتایج گزارش شده توسط Neves و همکاران (۲۰۱۰) و Frary و همکاران (۲۰۱۰) هماهنگی دارد. گزارش شده است که تنش‌های محیطی مختلف تجمع فلاونوئیدها از جمله آنتوسیانین‌ها و همچنین ترکیبات فنولیک را تحریک می‌نماید (Mo et al., 1992). همچنین، نتایج موجود نشان می‌دهد که تیمارهای تنشی به طور قابل ملاحظه‌ای ترکیبات فنلی را در شاخه‌های گیاهان *Zea mays* و *Vigna sinensis* افزایش می‌دهد (Nemat Alla et al., 2002). همچنین، پژوهش حاضر کاهش مقدار فنل کل در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش‌تیمار شده‌اند را نشان داد. کاهش مقدار فنل می‌تواند به علت کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر تولید آن باشد. از این رو، میزان فعالیت دو آنزیم PAL و TAL که در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی آنزیم‌های اصلی هستند، مورد سنجش قرار گرفت. Mehta و همکاران (۱۹۹۳) گزارش نمودند که محتوای ترکیبات فنلی به طور کلی در گیاه نخود با افزایش نمک‌های کلرید و سولفات افزایش می‌یابد. تجمع ترکیبات فنولیک و آنتوسیانین‌ها در گیاهان تحت تنش، با تحریک فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL همراه است. این نتایج، تأثیرات تنظیم‌کنندگی این آنزیم‌ها تشکیل آنتوسیانین‌ها و فنل‌ها از طریق تولید فیل پروپانویید که فلاونوئیدها از آن سنتز می‌شوند را تأیید می‌نماید. بنابراین، هر تغییری در فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در تغییر شکل متابولیسم این فرآورده‌های ثانویه دخالت خواهد داشت.

میزان فعالیت آنزیم PAL با مقدار فنل کل به دست آمده نوعی هماهنگی را نشان داد. به این معنی که در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین میزان فعالیت PAL تحت تأثیر تنش شوری افزایش یافته بود که در

پیش‌تیمار القاکننده مقاومت به تنش شوری در گیاه است. شاید بتوان چنین فرض نمود که پیش‌تیمار گیاه به مدت دو روز می‌تواند مشابه تزریق واکسن در افزایش توان سیستم ایمنی جانوری عمل نماید. به بیان دیگر، استفاده از اتانول آمین می‌تواند از طریق القای سازوکارهای مقاومتی از جمله پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه را برای سازگاری با شرایط سخت تنشی بعدی آماده نماید (Mascher, 2005 a,b; Rajaeian et al., 2011; Rajaeian and Ehsanpour, 2015). در حقیقت، مطابق با نتایج پیشین و داده‌های حاضر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله: آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز (Rajaeian and Ehsanpour, 2015) و ترکیبات غیر آنزیمی از جمله آنتوسیانین‌ها توان محافظت از غشا در مقابل آسیب اکسیداتیو ROS را دارند و می‌تواند به کاهش مقدار MDA منجر گردد. با وجود این، سازوکار دقیقی که اتانول آمین از طریق آن، مقاومت به تنش را القا می‌نماید هنوز به خوبی درک نشده است.

چنانچه به روشنی اثبات شده است تنش شوری می‌تواند به تولید ROS اضافی منجر گردد. برخی از گیاهان به منظور سازگاری با این شرایط مضر محیطی سنتز متابولیت‌های ثانویه گوناگون از جمله ترکیبات فنلی را القا می‌نمایند. در این راستا، به منظور آزمودن اثر پیش‌تیمار اتانول آمین روی گونه *Nicotiana rustica*، پاسخ‌های گیاهی، فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین‌ها پس از پیش‌تیمار با اتانول آمین تحت تنش شوری، بررسی و ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تنش شوری موجب افزایش مقدار فنل کل در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین می‌گردد. این نتیجه قابل پیش‌بینی است و با

تأثیر زیادی بر مقدار فنل کل ندارد و افزایش فعالیت آن لزوماً با افزایش مقدار فنل‌ها همراه نیست. در مطالعه حاضر، از میان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و در بین فلاونوئیدها آنتوسیانین‌ها بررسی شدند تا به این پرسش، پاسخ داده شود که آیا علت کاهش فنل‌ها، کاهش مقدار این دو گروه آنتی‌اکسیدان قوی است یا خیر؟ نتایج نشان داد که تنش شوری به افزایش مقدار فلاونوئیدها در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین منجر می‌گردد. داده‌های حاضر در مورد اثر تنش شوری بر افزایش مقدار فلاونوئید با نتایج Frary و همکاران (۲۰۱۰) که نشان دادند مقدار فلاونوئیدها در *Solanum pennelli* پس از تنش شوری افزایش می‌یابد و نتایج Mahmoudi و همکاران (۲۰۱۰) که نیز نشان دادند فلاونوئیدهای romaine lettuce پس از تیمار NaCl افزایش می‌یابد هماهنگی دارد. نتایج حاضر همچنین نشان داد که تنش شوری به افزایش مقدار آنتوسیانین‌ها در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین منجر می‌گردد. مقدار آنتوسیانین‌ها در توت‌فرنگی تحت شرایط تنش شوری نیز توسط Keutgen و Pawelzik (۲۰۰۸) بررسی شده است و اثبات شد که غلظت آنتوسیانین‌ها در این گیاهان پس از تیمار NaCl افزایش می‌یابد که در هماهنگی با نتایج حاضر در گیاه تنباکو است. Kaliamoorthy و Rao در سال ۱۹۹۴ افزایش ۴۰ درصدی تجمع آنتوسیانین‌ها در ذرت پس از تیمار با NaCl و KCl را گزارش دادند. نتایج حاضر نشان داد که پیش‌تیمار با اتانول آمین به افزایش مقدار آنتوسیانین‌ها و فلاونوئید در گیاه شاهد (گیاه بدون تنش شوری) منجر می‌گردد. در این رابطه، Ali و Ashraf (۲۰۱۱) گزارش دادند که استعمال خارجی گلايسين

هماهنگی با افزایش فنل کل در این گروه از گیاهان بود. از سوی دیگر، در گیاهان تحت تنش شوری که با اتانول آمین پیش‌تیمار شده بودند همگام با کاهش مقدار فنل فعالیت آنزیم PAL نیز کاهش یافت که می‌تواند توجیهی برای کاهش مقدار فنل کل تحت این شرایط باشد. نتایج بررسی در مورد میزان فعالیت آنزیم TAL در مسیر سنتز ترکیبات فنلی نشان داد که در گیاهان بدون پیش‌تیمار با اتانول آمین، تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم TAL می‌گردد. این نتیجه، در راستای افزایش مقدار فنل کل در این شرایط بوده و در این رابطه گزارش‌های متعددی نیز موجود است، برای نمونه، Nemat Alla و همکاران (۲۰۰۲) افزایش فعالیت آنزیم TAL در *Vigna sinensis* و *Zea mays* توسط تنش شوری را گزارش دادند. همچنین، افزایش فعالیت TAL در گیاهان تحت تنش شوری پیش‌تیمار شده با اتانول آمین مشاهده گردید. در این جا، بین کاهش مقدار فنل کل و افزایش فعالیت TAL نوعی تناقض مشاهده می‌شود. Dogbo و همکاران (۲۰۱۲) ثابت کردند که در TAL، Cassava در مقایسه با PAL نسبت به الیستور سالیسیک اسید حساس‌تر است. در مطالعه حاضر نیز شاید بتوان چنین فرض کرد که اتانول آمین همانند سالیسیک اسید به تحریک TAL در شرایط تنشی منجر شده اما بر PAL اثر افزایشی نداشته است. مسلم است که این فرضیه به آزمایش‌های دقیق نیاز دارد تا نحوه عملکرد دقیق اتانول آمین روی این دو آنزیم روشن شود. شاید بتوان چنین تناقضی را به نقش آنزیم TAL در مسیر سنتز ترکیبات فنلی نسبت داد. به بیان دیگر، از آنجا که این آنزیم در مقایسه با PAL، یک آنزیم کمکی است، فعالیت آن

پیش تیمار با اتانول آمین مربوط به مجموعه‌ای از ترکیبات خانواده فلاونوئیدها باشد. برای مثال، بایستی در این خانواده ترکیباتی نظیر: فلاون، فلاونول، فلاونون، ایزوفلاون را نیز در نظر داشت و ممکن است علیرغم افزایش آنتوسیانین‌ها برخی از این ترکیبات کاهش یافته باشد.

در مجموع، می‌توان گفت با توجه به داده‌های زیستی و رشد و نمو حاصل از بررسی پیش تیمار اتانول آمین (داده‌ها این بخش ارائه نشده است) رشد گیاه تنباکو در تنش شوری با پیش تیمار اتانول آمین بهبود معنی‌داری نشان داد و در نتیجه می‌توان گفت احتمالاً بخشی از این افزایش تحمل به شوری در گیاه تنباکو، می‌تواند به تغییر مسیر فل‌ها به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه مربوط باشد. از آنجا که پژوهش حاضر نخستین گزارش در زمینه تأثیر اتانول آمین بر ترکیبات فنلی است، بررسی‌های بیشتر و جامع‌تری به منظور آشکار شدن نحوه عملکرد اتانول آمین روی این گروه از آنتی‌اکسیدان‌ها لازم به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از دانشگاه اصفهان و قطب تنش‌های گیاهی به خاطر حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌نمایند.

بتیین موجب افزایش فلاونوئیدها در گیاه ذرت در شرایط عادی و تحت تنش خشکی می‌گردد. از آنجا که اتانول آمین پیش‌ساز بیوسنتز گلایسین بتیین است (Kogan *et al.*, 2000)، شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که پیش تیمار گیاه تنباکو با اتانول آمین به افزایش مقدار گلایسین بتیین منجر شده و این ترکیب نیز به نوبه خود مقدار فلاونوئیدها را افزایش داده است. نتایج همچنین نشان داد که پیش تیمار گیاه تنباکو با اتانول آمین تحت تنش شوری باعث کاهش مقدار فلاونوئید و در عین حال افزایش آنتوسیانین‌ها می‌گردد. با توجه به این شواهد گمان می‌رود در این گیاهان گلایسین بتیین حاصل از متابولیسم اتانول آمین در مسیر سنتز فلاونوئیدها به طور عمده در جهت تولید آنتوسیانین‌ها وارد شده باشد. همچنین، از آنجا که نقش گلایسین بتیین به عنوان اسمولیت سازگار، حفاظت از ساختار چهارم آنزیم‌ها و حفظ تمامیت غشا در غلظت بالای نمک است (Chen and Murata, 2002)، می‌توان چنین فرض نمود که گلایسین بتیین برای غلبه بر آثار مخرب تنش شوری در گیاه تنباکو به جای افزایش محتوای فلاونوئید کل بیشتر در جهت ایفای چنین نقش‌هایی وارد شده باشد. از سوی دیگر، شاید بتوان چنین استنباط نمود که احتمالاً کاهش فلاونوئید کل گیاه و افزایش آنتوسیانین‌ها در تنش شوری تحت

### منابع

- Ali, Q. and Ashraf, M. (2011) Exogenously applied glycinebetaine enhances seed and seed oil quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 71: 249-259.
- Beaudoin-Eagan, L. D. and Thorpe, T. A. (1985) Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology* 78: 438-441.
- 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.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chen, T. H. and Murata, N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 250-257.
- Dai, J. and Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- Dogbo, D., Gogbeu, S., N'zue, B., Ya, K., Zohouri, G., Mamyrbekova-Bekro, J. and Bekro, Y. A. (2012) Comparative activities of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase and phenolic compounds accumulated in cassava elicited cell. *African Crop Science Journal* 20: 85-94.
- Frary, A., Göl, D., Keleş, D., Ökmen, B., Pınar, H., Şığva, H. Ö., Yemenicioğlu, A. and Doğanlar, S. (2010) Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology* 10: 58-74
- Gumul, D., Korus, J. and Achremowicz, B. (2007) The influence of extrusion on the content of polyphenols and antioxidant/antiradical activity of rye grains (*Secale cereale* L.). *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia* 6: 103-111.
- Health, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hoagland, R. E. and Duke, S. O. (1981) Effect of herbicides on extractable phenylalanine ammonia lyase activity in light- and dark-grown soybean (*Glycine max*) seedlings. *Weed Science* 29: 433-439.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. and Verma, D. P. S. (2000) Removal of Feedback Inhibition of  $\Delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* 122: 1129-1136.
- Kaliamoorthy, S. and Rao, A. S. (1994) Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize. *Indian Journal of Plant Physiology* 37: 169-170.
- Keutgen, A. J. and Pawelzik, E. (2008) Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chemistry* 107: 1413-1420.
- Kogan, M. J., Kristoff, G., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (2000) Effect of pre-treatment with ethanolamine on the response of *Helianthus annuus* L. to salt stress. *Plant Growth Regulation* 30: 87-94.
- Król, A., Amarowicz, R. and Weidner, S. (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1491-1499.
- Kunert, K. J. and Ederer, M. (1985) Leaf aging and lipid peroxidation: the role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiologia plantarum* 65: 85-88.
- Laby, R. J., Kincaid, M. S., Kim, D. and Gibson, S. I. (2000) The Arabidopsis sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *The Plant Journal* 23: 587-596.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R. and Kanner, J. (1999) pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 67-70.
- Mahmoudi, H., Huang, J., Gruber, M. Y., Kaddour, R., Lachaâl, M., Ouerghi, Z. and Hannoufa, A. (2010) The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite

- accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 5122-5130.
- Mascher, R., Fischer, S., Scheiding, W., Neagoe, A. and Bergmann, H. (2005b) Exogenous 2-aminoethanol can diminish paraquat induced oxidative stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Growth Regulation* 45: 103-112.
- Mascher, R., Nagy, E., Lippmann, B., Hornlein, S., Fischer, S., Scheiding, W., Neagoe, A. and Bergmann, H. (2005a) Improvement of stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) by 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *Plant Science* 168: 691-6984.
- Mehta, N., Bharti, S. and Datta, K. S. (1993) Effect of chloride and sulphate salinities on the concentration of some important metabolites in chickpea. *Haryana Agricultural University Journal Research* 23: 150-155.
- Mo, Y., Nagel, C. and Taylor, L. P. (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 89: 7213-7217.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Nemat Alla, M., Elbaz Younis, M., El-Shihaby, O. A. and El-Bastawisy, Z. (2002) Kinetin regulation of growth and secondary metabolism in waterlogging and salinity treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *ACTA Physiologiae Plantarum* 24(1): 19-27.
- Neves, G., Marchiosi, R., Ferrarese, M., Siqueira-Soares, R. and Ferrarese-Filho, O. (2010) Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 467-473.
- Rajaeian, S. and Ehsanpour, A. A. (2015) Physiological responses of tobacco plants (*Nicotiana rustica*) pretreated with ethanolamine to salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 62: 246-252.
- Rajaeian, S., Heidari, R. and Ehsanpour, A. (2011) Effect of 2-aminoethanol pretreatment on the antioxidant enzyme activity in *Zea mays* under oxidative stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 45-50.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A. and Jiménez-Bremont, J. F. (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 82-92.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.



## روند تکامل صفات ریخت‌شناسی گونه‌های *Astragalus dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* بر اساس تبارزایی داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matK*

فرحناز جوانمردی \*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

### چکیده

در مطالعه حاضر، روند تکامل صفات ریخت‌شناسی گونه‌های *Astragalus dictyolobus* و *A. tawilicus* (که پیش از این در بخشه *Laxiflori* طبقه‌بندی می‌شدند) و گونه *A. victoriae* (که پیش از این در بخشه *Christianophysa* قرار داشته است)، با سایر گونه‌های بخشه *Alopecuroidei* بر اساس داده‌های حاصل از تبارزایی توالی کلروپلاستی *matK* ارایه شده است. ۲۵ گونه از بخشه *Alopecuroidei* همراه با دو گونه *A. basineri* و *A. sieversianus* متعلق به بخشه *Astragalus* به عنوان برون‌گروه بررسی شد. ۱۲ صفت ریخت‌شناسی رویشی و زایشی انتخاب و حالت‌های مختلف آنها در قالب تبارزایی داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matK* بررسی شد. پژوهش حاضر بیانگر این است که وضعیت نیام داخل کاسه، تراکم گل آذین و شکل گل آذین با نتایج حاصل از داده‌های مولکولی انطباق ندارد و مصنوعی بودن این صفات را در رده‌بندی‌های قبلی بخشه *Alopecuroidei* نشان می‌دهد. وجود براکتول و شکل تخمدان صفاتی هستند که با تبارزایی حاصل از *matK* cpDNA مطابقت دارد. وجود دمگل آذین در دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* نشان می‌دهد که آنها خویشاوندی نزدیکی با سایر گونه‌های *Alopecuroidei* دارند. صفت تنک بودن گل آذین، گونه *A. victoriae* را به دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* نزدیک می‌کند. سایر صفات ذکر شده به استثنای تنک بودن گل آذین آن را به بخشه *Alopecuroidei* نزدیک می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** *Astragalus dictyolobus*، *A. tawilicus*، *A. victoriae*، توالی کلروپلاستی *matK* ریخت‌شناسی

### مقدمه

توالی تکراری معکوس (IRLC, Inverted Repeat)

Lacking Clade) بزرگترین جنس گیاه آوندی روی

کره زمین شناخته شده و دارای حدود ۳۰۰۰ گونه و

جنس گون *L. Astragalus* متعلق به تیره

*Fabaceae* و زیرتیره *Papilionoideae* و کلاد فاقد

می‌شکافد (Podlech, 1999؛ Maassoumi, 2003).  
 سه گونه *Astragalus dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. phlomoides* که قبلاً جزو بخشه *Alopecuroidei* به شمار می‌رفتند، در سال ۱۹۷۷ توسط Agerer- Kirchhoff و Agerer به بخشه جدید *Laxiflori* (لکتوتیپ: *A. dictyolobus*) منتقل شدند که اختلاف آنها با بخشه *Alopecuroidei* در کشیده و تنک بودن گل آذین است. به دنبال آن، در سال ۱۹۹۹ بخشه *Laxiflori* توسط Podlech در فلورا ایرانیکا پذیرفته شد. Ranjbar و همکاران (۲۰۰۲) به دلیل عدم کفایت ویژگی‌های ریخت‌شناسی، *A. phlomoides* را از بخشه *Laxiflori* به بخشه *Alopecuroidei* منتقل کردند. آنها معتقد بودند که وجود گل آذین متراکم در *A. phlomoides* این گونه را به بخشه *Alopecuroidei* نزدیک می‌کند. Maassoumi (۲۰۰۳) انتقال این گونه را به *Alopecuroidei* پذیرفت. از نظر پراکنندگی جغرافیایی بخشه *Laxiflori* متعلق به ناحیه ایرانی- تورانی است. گونه *A. dictyolobus* انحصاری ایران است و *A. tawilicus* در ایران و عراق رویش دارد (Maassoumi, 2003).

بخشه *Christianophysa* Podl. and Kirch. با گونه *A. victoriae* (مترادف با *A. matthewsiae* Agerer-Kirchhoff and Podlech) معرفی شد. این گونه بوم‌زاد ترکیه است. دارای گوشوارک‌های غشایی که آزاد است اما در قسمت قاعده به یکدیگر پیوستگی دارند. کاسه در زمان میوه‌دهی متورم، جام گل بدون کُرک، گل آذین سر سان، خوشه‌ای و نامتراکم، بدون دم‌گل آذین و نیام دو حجره‌ای است (Agerer- Kirchhoff and Podlech, 1974).

۲۴۵ بخشه است. بیشترین تنوع این جنس در آسیای جنوب شرقی و آسیای مرکزی بوده و ایران به تنهایی با بیش از ۸۵۰ گونه یکی از مهم‌ترین مراکز تنوع این جنس است (Lock and Simpson, 1991؛ Podlech, 1999؛ Maassoumi, 1998, 2003؛ Lock and Maassoumi, 1998, 2003؛ Schrier, 2005؛ Chaudhary et al., 2008؛ Asgari, 2010؛ Nematian et al., 2010؛ Ranjbar et al., 2010).  
 جنس *Astragalus* عموماً در نواحی کوهستانی خشک و نیمه‌خشک نیمکره شمالی و آمریکای جنوبی رویش دارد (Polhill, 1981). این جنس در ایران دارای ۷۰ بخشه است که پنج بخشه آن انحصاری ایران است (Maassoumi, 1986, 2005). یکی از بخشه‌های این جنس *Alopecuroidei* DC. است. این بخشه با دارا بودن ۵۰ گونه، پراکنش وسیعی در ایران، ترکیه و روسیه دارد (Chamberlain and Goncharov et al., 1965؛ Maassoumi, 1970؛ Becht, 1978؛ Matthews, 1970؛ Podlech, 1999؛ 1995, 1998, 2005). از این بخشه ۲۷ گونه در ایران وجود دارد که ۱۶ گونه بوم‌زاد است (Maassoumi, 1996؛ Maassoumi and Ranjbar, 1996؛ Ranjbar and Podlech, 1999؛ 1998, 2003, 2005؛ Karamian, 2003).

این بخشه شامل گیاهانی چند ساله، علفی با قاعده چوبی، دارای گوشوارک سرنیزه‌ای گاهی پهن، غشایی یا علفی، در قاعده اندکی چسبیده به دم‌برگ، جدا از یکدیگر، بدون کُرک، کُرک‌دار یا در حاشیه مژک‌دار است. گل آذین سر سان، کروی، بیضوی کشیده یا دم‌روباهی، کاسه لوله‌ای یا استکانی پوشیده از کُرک‌های بلند، در ابتدا با تورم کم، پس از میوه کاملاً متورم، است. جام زرد، میوه شبه تخم‌مرغی و دو حجره‌ای که کاسه را

طول دارد (Neuhaus and Link, 1987). این ژن، در مقایسه با سایر ژن‌های پلاستییدی دارای روند تکاملی سریعتری در بین گیاهان خشکی است. از ژن *matK* به دلیل سرعت جایگزینی بالا می‌توان برای رده‌بندی در سطوح پایین از جمله روابط بین گونه‌ها استفاده کرد. ژن پلاستییدی *matK* در پژوهش‌های متعدد در مورد زیرگروه‌های Papilionoideae برای حل روابط بین گونه‌های خویشاوند نزدیک، نتایج بسیار خوبی داده است (Steele and Wojciechowski, Hu et al., 2000)؛ (Wojciechowski et al., 2004؛ 2003).

در پژوهش حاضر، ۱۲ صفت رویشی و زایشی که میزان جورگرایی کمتری نشان داده و در رده‌بندی‌های پیشین بخشه *Alopecuroidei* و خویشاوندانش مورد تأکید بودند (Goncharov et al., 1965؛ Ranjbar et al., 2002؛ Maassoumi, 1995) انتخاب شدند. حالت‌های مختلف این صفات ریخت‌شناسی در قالب تبارزایی داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matK* بررسی شد. با توجه به این که گونه‌های *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* و *A. victoriae* قبلاً بر اساس چند ویژگی ریخت‌شناسی در بخشه‌های دیگر (*Laxiflori* و *Christianophysa*) قرار گرفته بودند و سپس بر اساس داده‌های مولکولی به بخشه *Alopecuroidei* منتقل شدند، ضرورت بررسی روند تکاملی صفات مذکور در چارچوب فیلوژنی مولکولی مشخص می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، بررسی روند تکامل صفات ریخت‌شناسی گونه‌های *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* و *A. victoriae* با سایر گونه‌های بخشه *Alopecuroidei* در چارچوب فیلوژنی مولکولی است که تا به امروز بررسی نشده است.

روابط فیلوژنتیک بین گونه‌های دنیای قدیم بر اساس توالی هسته‌ای ITS و ژن کلروپلاستی *ndhF* توسط Kazempour Osaloo و همکاران (۲۰۰۳ و ۲۰۰۵) بررسی شده است. در بین گونه‌های مطالعه شده، تنها ۴ گونه از بخشه *Alopecuroidei* بررسی شده و بیانگر این است که این بخشه پارافلیتیک بوده و ارتباطش با بخشه‌های خویشاوند مشخص نشده است. مطالعه Javanmardi و همکاران (۲۰۱۲a) در مورد بخشه *Alopecuroidei* بر اساس ترکیبی از صفات ریخت‌شناسی و داده‌های حاصل از توالی هسته‌ای ITS نشان داد که گروه‌های گونه‌ای که قبلاً توسط Maassoumi (۱۹۹۵) ارائه شده بود، فقط گروه گونه‌ای *Kirindicus* و *Turbinatus* تک‌تبار هستند. مطالعات Javanmardi و همکاران (۲۰۱۲b) پیرامون بخشه *Alopecuroidei* و خویشاوندانش بر اساس توالی هسته‌ای ITS و سه توالی کلروپلاستی *matK*، *trnH-psbA* و *trnT-trnY* تأیید کرد که این بخشه تک‌تبار نیست و بخشه *Laxiflori* با دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* و همچنین بخشه *Christianophysa* با تک‌گونه *A. victoriae* بایستی در بخشه *Alopecuroidei* ادغام شود. با توجه به این که داده‌های مولکولی بیانگر این است که گونه‌های *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* و *A. victoriae* در بخشه *Alopecuroidei* قرار می‌گیرند، اما انطباق آن با داده‌های ریخت‌شناسی هنوز بررسی نشده است.

در پژوهش حاضر، به منظور بررسی انطباق صفات ریخت‌شناسی گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* با سایر گونه‌های بخشه *Alopecuroidei* داده‌های حاصل از تبارزایی توالی کلروپلاستی *matK* استفاده شده است. *matK* یک ژن کلروپلاستی است که بخشی از ایترون *trnK* است و حدود ۱۵۰۰ جفت باز

## مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، فیلوژنی ۲۵ گونه از بخشه *Alopecuroidei* بر اساس داده‌های حاصل از صفات ریخت‌شناسی بررسی و تحلیل شد. بر اساس مطالعات Kazempour Osaloo و همکاران (۲۰۰۳ و ۲۰۰۵)، دو گونه *A. sieversianus* و *A. basineri* متعلق به بخشه *Astragalus* به عنوان برون‌گروه انتخاب و استفاده شدند. پس از انجام مطالعات ریخت‌شناسی، ۱۲ صفت انتخاب شد و حالت‌های مختلف این صفات به دست آمد (جدول ۱). حالت‌های مختلف صفات رویشی و زایشی در مورد گونه *A. victoriae* با بررسی نمونه هرباریومی دانشگاه

مونیک و با استفاده از فلور ترکیه (Chamberlain and Matthews, 1970) و مقالات مرتبط (Agerer- Kirchoff and Podlech, 1974) انجام شد و در مورد گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و سایر گونه‌های بخشه *Alopecuroidei* بر اساس مطالعات انجام شده روی نمونه‌های هرباریومی (مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور)، فلور روسیه (Goncharov et al., 1965)، گون‌های ایران (Maassoumi, 1995)، فلورا ایرانیکا (Podlech, 1999)، فلور ایران (Maassoumi, 2003) و مقالات مرتبط (Ranjbar et al., 2002)؛ Ranjbar and Karamian, 2003) به دست آمد.

جدول ۱- صفات و حالت‌های صفات بررسی شده در بررسی روند تکامل صفات

حالت‌های صفات	صفات
میوه از کاسه خارج یا آن را می‌شکافد (۰) میوه در کاسه محبوس می‌ماند (۱)	۱- وضعیت میوه داخل کاسه
بدون گُرک (۰) گُرک دار (۱)	۲- وجود گُرک روی جام گل
استوانه‌ای (۰) کروی/تخم‌مرغی (۱)	۳- شکل گل آذین
تُنک (۰) متراکم (۱)	۴- تراکم گل آذین
بدون دمگل آذین (۰) دارای دمگل آذین (۱)	۵- وجود دمگل آذین
علفی (۰) غشایی (۱)	۶- جنس گوشواره
گُرک دار (۰) بدون گُرک (۱)	۷- وجود گُرک روی گوشواره
گُرک دار (۰) بدون گُرک (۱)	۸- وجود گُرک روی ساقه گیاه
لوله‌ای (۰) استکانی (۱)	۹- شکل کاسه در زمان گل‌دهی
بیش از ۱۷ جفت (۰) کمتر یا مساوی ۱۷ جفت (۱)	۱۰- تعداد برگچه
بدون براکتول (۰) دارای براکتول (۱)	۱۱- وجود براکتول
تخم‌مرغی (۰) دوکی (۱)	۱۲- شکل تخمدان

مکان‌نگاری در قالب تبارزایی مشخص می‌شود. قطیبت صفات با استفاده از روش برون‌گروه تعیین شد (Maddison et al., 1984). حالت‌های صفات استفاده شده و کدهای مربوط در جدول ۱ و ماتریس داده‌های ریخت‌شناسی در جدول ۲ آورده شده است. بازسازی

حالت‌های صفات با ارزش‌گذاری عددی به صورت نامرتب (تغییر از حالتی به حالت دیگر یک گام است unordered: کد‌گذاری شد. ارزش‌های داده شده به حالت‌های مختلف صفات، هیچ‌گونه برتری نسبت به یکدیگر نداشته و نیایی یا پیشرفته بودن آنها تنها پس از

اطلاعاتی (AIC) Akaike (Posada and Buckley, 2004) انتخاب شد. بر اساس این تحلیل، داده‌های حاصل از ژن کلروپلاستی *matK* با استفاده از مدل GTR+G بررسی شدند. سپس با استفاده از نرم افزار Mesquite نسخه ۲/۷۴ ماتریس داده‌های ریخت‌شناسی بر درخت حاصل از داده‌های مولکولی مکان‌نگاری گردید (Maddison and Maddison, 2010).

روابط فیلوژنی داده‌های توالی کلروپلاستی *matK* بر اساس روش Maximum Parsimony در نرم‌افزار Bayesian PAUP\* 4.b10 (Swofford, 2002) و روش MrBayes نسخه ۳/۱/۲ (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) انجام شد. مدل تکاملی با استفاده از برنامه MrModeltest نسخه ۲/۳ (Nylander, 2004)، اجرا شده در MrMTgui (Nuin, 2005) بر اساس معیار

جدول ۲- ماتریس صفات مورد استفاده در بررسی روند تکامل صفات {01}a

نام تاکسون	کد صفات	نام تاکسون	کد صفات
<i>A. ajubensis</i>	001110011100	<i>A. neoassadianus</i>	001110100100
<i>A. alopecias</i>	000101000000	<i>A. obtusifolius</i>	00111100a111
<i>A. alopecurus</i>	000111001001	<i>A. phlomoides</i>	001a10110100
<i>A. dictyolobus</i>	110010000001	<i>A. ponticus</i>	011111010100
<i>A. echinops</i>	00111100a110	<i>A. saetiger</i>	001110001000
<i>A. foliosus</i>	00111000a001	<i>A. schahrudensis</i>	001110010100
<i>A. hamadanus</i>	001110001001	<i>A. speciosus</i>	001110000100
<i>A. hymenocalyx</i>	001110010001	<i>A. tawilicus</i>	11001100a001
<i>A. jessenii</i>	00111000a100	<i>A. turbinatus</i>	01111100a000
<i>A. kirrindicus</i>	001111000110	<i>A. victoriae</i>	100001101100
<i>A. maaboudii</i>	001010000100	<i>A. zarjabadensis</i>	001110000100
<i>A. macrocephalus</i>	00111011a100	<i>A. sieversianus</i>	000000000000
<i>A. megalotropis</i>	001111001100	<i>A. basineri</i>	000000000000
<i>A. meridionalis</i>	001111001110		

## نتایج

براکتسول (صفت ۱۱) هیچگونه یکنواختی نشان نمی‌دهد. پس از آن، بالاترین میزان CI مربوط به صفات وضعیت میوه داخل کاسه (صفت ۱)، وجود دمگل آذین (صفت ۵) و شکل تخمدان (صفت ۱۲) است، که در آنها CI برابر با ۰/۵ است. سپس، صفت تراکم گل آذین (صفت ۴) جورگرایی کمتری را نسبت به سایر صفات نشان می‌دهد که در آن CI برابر با ۰/۳۳ است. کمترین میزان CI برابر با ۰/۱۱ و مربوط به صفت شکل کاسه در زمان گل‌دهی (صفت ۹) است. روند تکامل صفات در مورد شش صفت که جورگرایی کمتری نشان می‌دهند، مورد بحث قرار می‌گیرد.

تحلیل ۱۲ صفت مورد بررسی برای بخشه *Alopecuroidei* انجام شد. در جدول ۳ مقادیر شاخص‌های آماری CI (شاخص سازگاری یا consistency index) و RI (شاخص پایداری یا retention index)، نوع، حالت و تعداد تغییرات برای هر صفت آورده شده است (شماره هر صفت مربوط به جدول ۱ است). از میان ۱۲ صفت ریخت‌شناسی، شش صفت که جورگرایی کمتری را نشان می‌دهد، انتخاب و روند تکامل صفات در آنها بررسی شد. از میان صفات مطالعه شده، تنها صفت وجود

شکل ۳ روند تکامل صفت تراکم گل آذین (صفت ۴) را نشان می‌دهد. تنک بودن گل آذین صفتی نیایی است که در اغلب گونه‌های بخشه Alopecuroidei به شکل پیشرفته گل آذین متراکم تکامل یافته است. بازگشت به حالت ابتدایی در سه گونه *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* دیده می‌شود.

صفت وجود دمگل آذین (صفت ۵) در شکل ۴ نشان داده شده است. فقدان دمگل آذین در بین گونه‌های مطالعه شده، حالتی نیایی است که به وضعیت دارای دمگل آذین تکامل می‌یابد. گونه‌های *A. alopecias* و *A. victoriae* حالت نیایی یعنی فقدان دمگل آذین را نشان می‌دهند.

شکل ۵ روند تکامل صفت وجود براکتول (صفت ۱۱) را نشان می‌دهد. در بین گونه‌های مطالعه شده، فقدان براکتول، صفتی نیایی است. این وضعیت در گونه‌های *A. meridionalis*، *A. kirrindicus*، *A. echinops* و *A. obtusifolius* به صورت دارای براکتول تکامل یافته است.

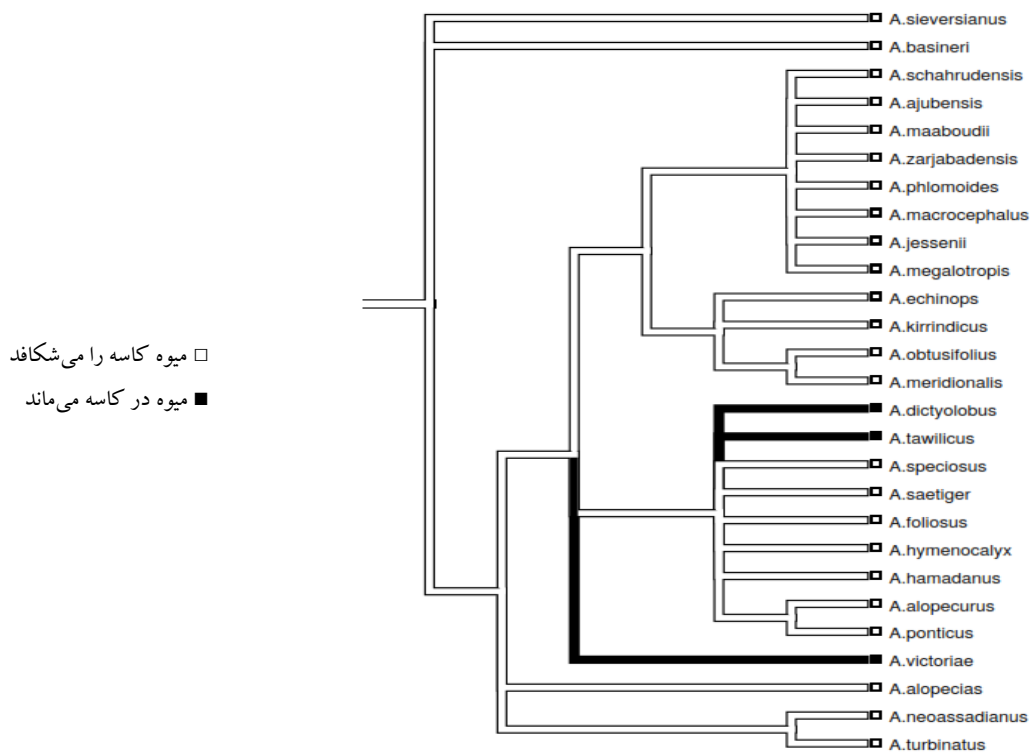
روند تکامل صفت شکل تخمدان (صفت ۱۲) در شکل ۶ نشان داده شده است. تخمدان تخم‌مرغی در گونه‌های مطالعه شده، وضعیت نیایی را نشان می‌دهد. تغییر از وضعیت تخمدان تخم‌مرغی به تخمدان دوکی، در گونه *A. victoriae* و تبار نزدیک به آن که متشکل از ۹ گونه (*A. foliosus*، *A. dictyolobus*، *A. alopecurus*، *A. ponticus*، *A. hymenocalyx*، *A. hamadanus*، *A. tawilicus*، *A. speciosus*، *A. saetiger*) است، مشاهده می‌شود.

جدول ۳- شاخص‌های آماری، نوع، حالت و تعداد تغییرات برای هر صفت ریخت‌شناسی مکان‌نگاری شده در باصرفه‌ترین درخت حاصل از تحلیل داده‌های cpDNA *matK*

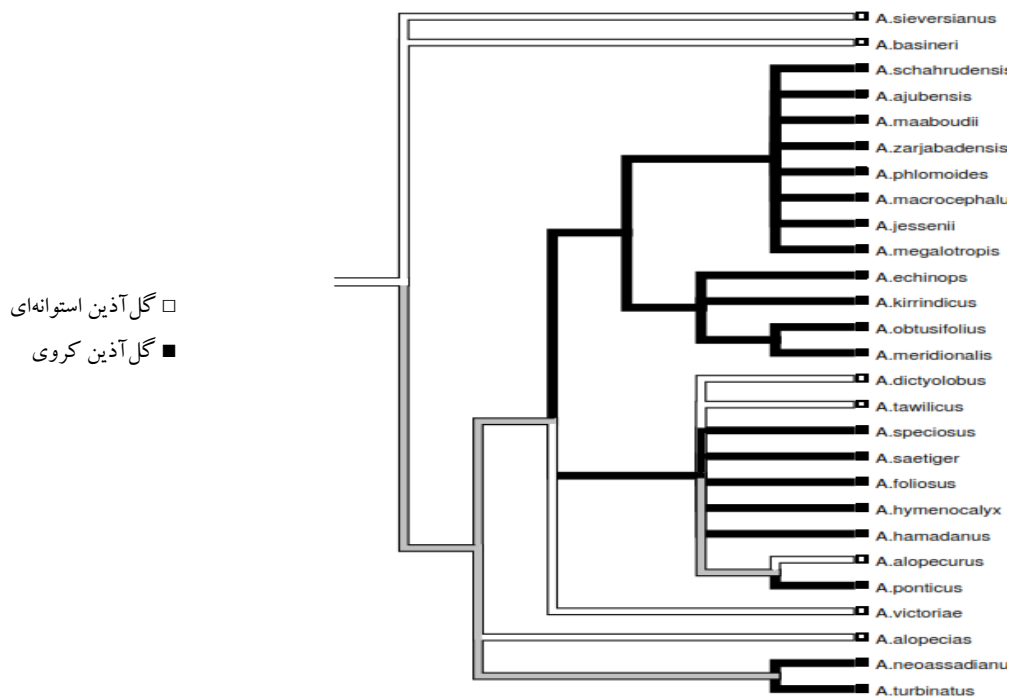
شماره صفت	نوع صفت	حالات صفت	تعداد گام	شاخص سازگاری	شاخص پایداری
۱	نامرتب	۲	۲	۰/۵۰	۰
۲	نامرتب	۲	۲	۰/۲۵	۰/۲۵
۳	نامرتب	۲	۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۴	نامرتب	۲	۳	۰/۱	۰/۶
۵	نامرتب	۲	۲	۰/۵۰	۰
۶	نامرتب	۲	۷	۰/۱۵	۰/۳۸
۷	نامرتب	۲	۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۸	نامرتب	۲	۶	۰/۱۷	۰/۳۸
۹	نامرتب	۲	۹	۰/۱۱	۰/۲۷
۱۰	نامرتب	۲	۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۱	نامرتب	۲	۱	۱	۱
۱۲	نامرتب	۲	۲	۰/۵۰	۰

شکل ۱ صفت وضعیت میوه داخل کاسه (صفت ۱) را نشان می‌دهد. خروج نیام از کاسه یا شکافتن کاسه در زمان میوه‌دهی، صفتی نیایی است که در اغلب تاکسون‌های مورد مطالعه دیده می‌شود. تنها در گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* این وضعیت به شکل باقی ماندن نیام در کاسه در زمان میوه‌دهی تکامل می‌یابد.

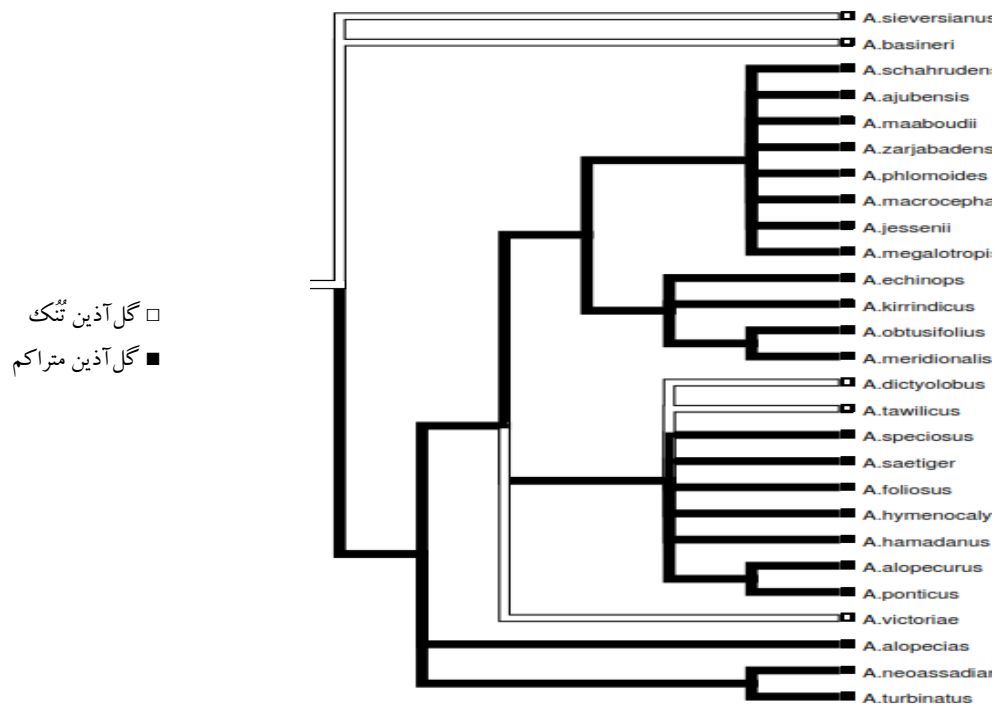
شکل ۲ روند تکامل صفت شکل گل آذین (صفت ۳) را نشان می‌دهد. استوانه‌ای بودن گل آذین، وضعیت ابتدایی در گونه‌های مورد مطالعه است. کروی یا تخم‌مرغی بودن گل آذین حالت پیشرفته صفت است. در گونه‌های *A. alopecurus*، *A. alopecias*، *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* گل آذین استوانه‌ای است.



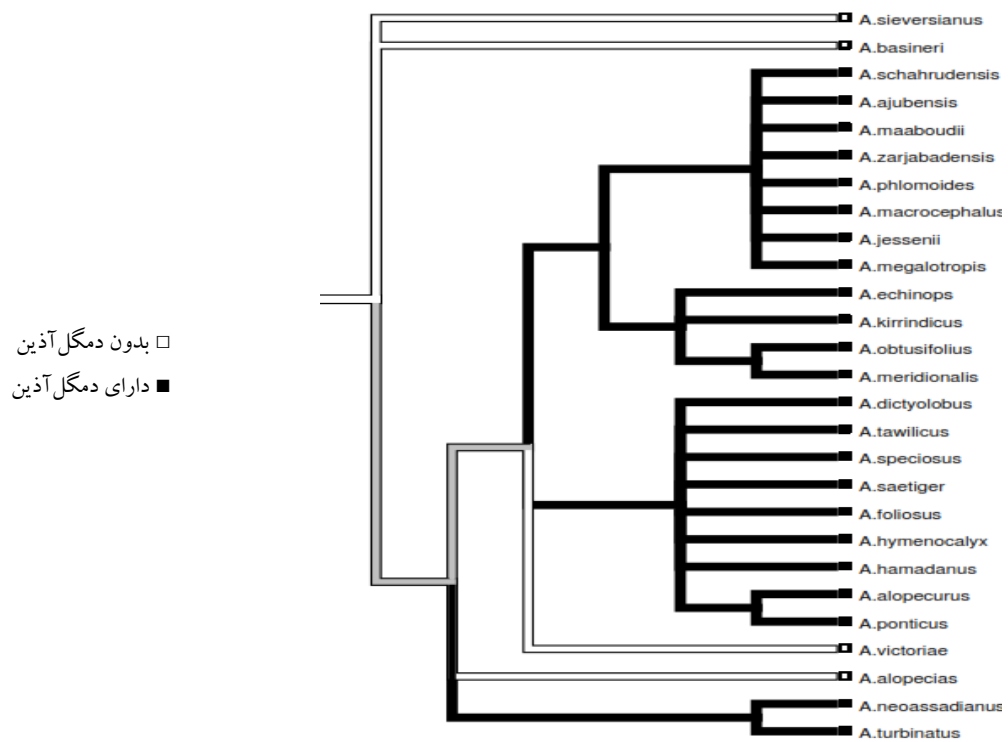
شکل ۱- روند تکامل صفت وضعیت نیام داخل کاسه در انطباق با تبارزایی حاصل از cpDNA *matK*



شکل ۲- روند تکامل صفت شکل گل آذین در انطباق با تبارزایی حاصل از cpDNA *matK*

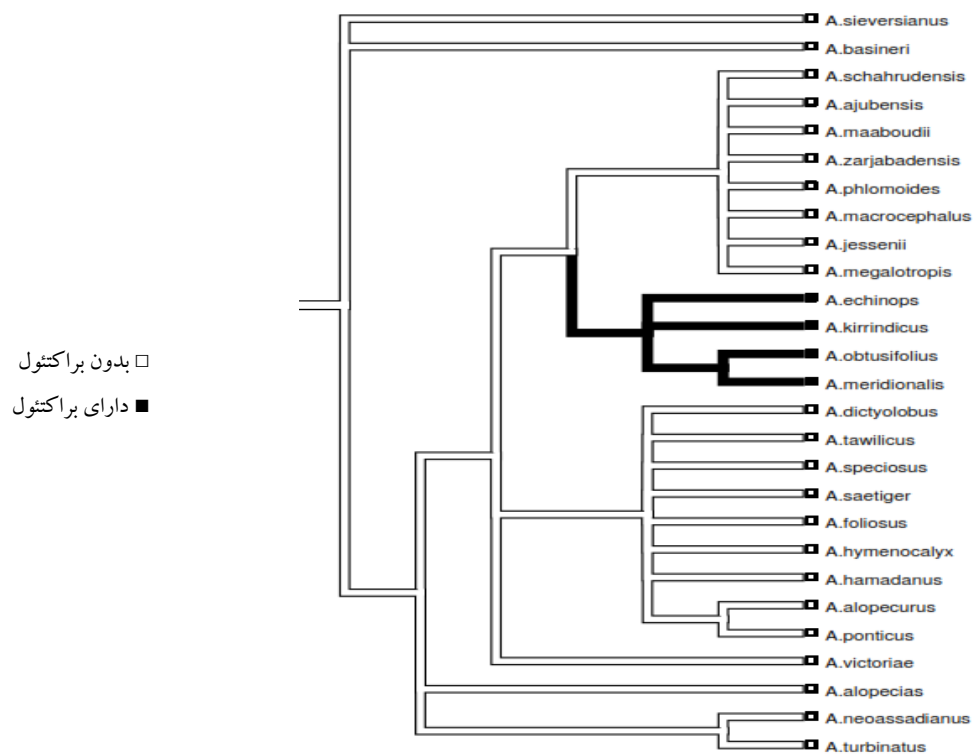


شکل ۳- روند تکامل صفت تراکم گل آذین در انطباق با تبارزایی حاصل از cpDNA matK

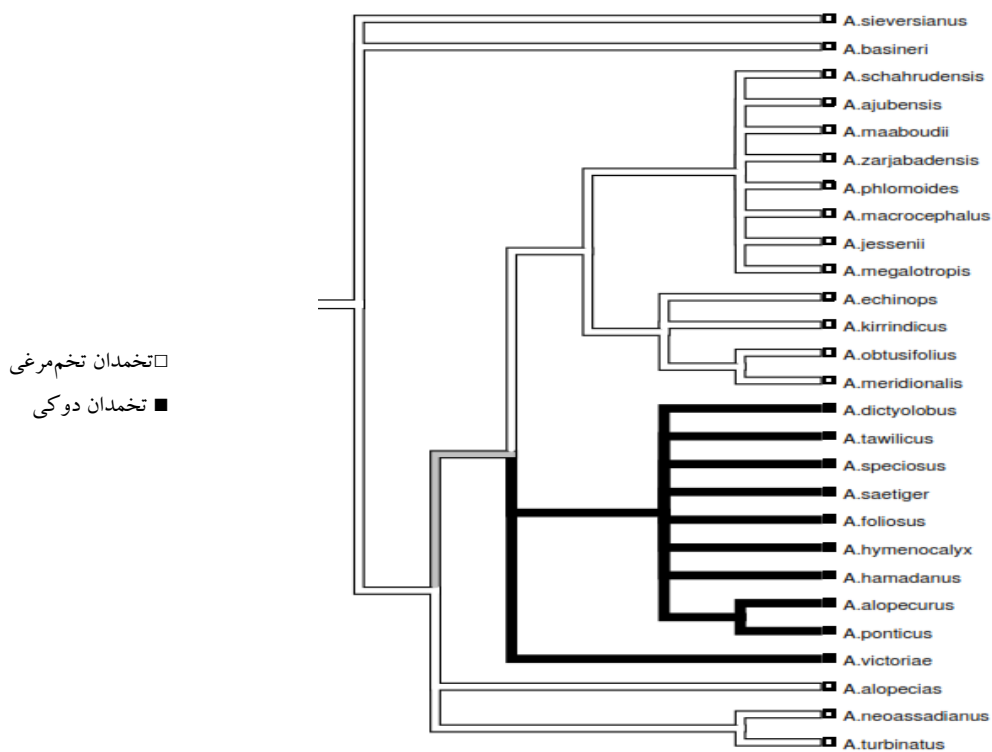


شکل ۴- روند تکامل صفت وجود دمگل آذین در انطباق با تبارزایی حاصل از cpDNA matK





شکل ۵- روند تکامل صفت وجود براکتول در انطباق با تبارزایی حاصل از cpDNA *matK*



شکل ۶- روند تکامل صفت شکل تخمدان در انطباق با تبارزایی حاصل از cpDNA *matK*

## بحث

مقادیر اندک اندازه‌گیری شده شاخص‌های آماری برای صفات ریخت‌شناسی نشان‌دهنده میزان یکنواختی فراوان در صفات ریخت‌شناسی این بخشه و خویشاوندانش است (جدول ۳). تعداد تغییرات اغلب صفات زیاد نیست، اما از آنجا که تعداد حالت‌های صفات به ازای هر صفت محدود است، شاخص CI و RI برخی از این صفات کاهش و در مقابل، میزان یکنواختی افزایش می‌یابد (Sanderson, 1989; Sanderson and Hufford, 1996).

از میان شش صفت مطالعه شده، صفات‌های: وضعیت میوه داخل کاسه، تراکم گل‌آذین، وجود دمگل‌آذین، وجود پراکتول و شکل تخمدان (صفات ۱، ۴، ۵، ۱۱ و ۱۲) دارای ضریب CI بین ۱ تا ۰/۳۳ هستند که بالاترین ضرایب در بین صفات مورد بررسی است و در نتیجه پایین‌ترین میزان جورگرایی را نشان می‌دهند. این پنج صفت در رده‌بندی‌های گذشته این بخشه نیز کاربرد داشته است (Maassoumi, Goncharov et al., 1965; Ranjbar et al., 2002; 1995). میزان ضریب CI در صفت شماره ۳ یعنی شکل گل‌آذین ۰/۲۵ است. سه صفت: وجود گُرک روی جام گل، وجود گُرک روی گوشواره و تعداد برگچه (صفات ۲، ۷ و ۱۰) نیز این ضریب سازگاری را نشان می‌دهند. علت انتخاب صفت شکل گل‌آذین در پژوهش حاضر، اهمیت آن در رده‌بندی‌های گذشته بوده است. در رده‌بندی Goncharov و همکاران (۱۹۶۵) در فلور روسیه سه زیربخشه معرفی شده که بر اساس شکل گل‌آذین به چند سری تقسیم‌بندی شده است. در رده‌بندی Maassoumi (۱۹۹۵) و رده‌بندی Ranjbar و همکاران (۲۰۰۲) نیز از

این صفت در تقسیم‌بندی گروه‌های گونه‌ای غیر رسمی استفاده شده است. برای سایر صفات با میزان شاخص سازگاری ۰/۲۵ و کمتر از آن نیز با استفاده از نرم‌افزار Mesquite درخت ترسیم شده است اما هیچکدام تأثیری در رده‌بندی‌ها و اصلاح آن ندارد و به همین دلیل شش صفت مذکور انتخاب شدند.

خروج نیام از کاسه یا شکافتن کاسه در زمان میوه‌دهی، صفتی نیایی است که در نیای مشترک تمامی تاکسون‌های مورد مطالعه حفظ شده است. تبدیل آن به میوه‌ای که در کاسه محبوس می‌ماند، چندین بار به صورت تکامل موازی در گونه‌های *A. victoriae* همچنین دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* اتفاق افتاده است (شکل ۱). در این سه گونه که قبلاً در بخشه‌های *Christianophysa* و *Laxiflora* طبقه‌بندی می‌شدند، میوه نیام درون کاسه محبوس می‌ماند. Podlech (۱۹۹۹) و Maassoumi (۲۰۰۳) بخشه *Alopecuroidei* را با میوه شبه تخم‌مرغی و دو حجره‌ای که کاسه را می‌شکافد مشخص کردند. Agerer-Kirchhoff (۱۹۷۶) محبوس بودن میوه رسیده درون کاسبرگ‌ها را به عنوان اختلاف بین بخشه *Laxiflora* و *Alopecuroidei* عنوان کرد. Agerer-Kirchhoff و Podlech (۱۹۷۴) معتقد بودند که این ویژگی ریخت‌شناسی، گونه *A. victoriae* را به دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* نزدیک می‌کند. با وجود این که داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matk* نشان می‌دهد که گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* به خوبی در میان گونه‌های بخشه *Alopecuroidei* قرار می‌گیرند، اما در پژوهش حاضر مشخص می‌شود که صفت وضعیت نیام

*A. dictyolobus* و *A. tawilicus* را به عنوان خویشاوندان نزدیک بخشه *Alopecuroidei* در نظر گرفتند.

دو گونه *A. alopecias* و *A. victoriae* صفت نیایی فقدان دمگل آذین را نشان می‌دهند. گونه‌های *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* همراه با سایر اعضای بخشه *Alopecuroidei* دارای دمگل آذین هستند (شکل ۴). *A. alopecias* با گل آذین دم روباهی بلند، فقدان دمگل آذین و میوه‌های کوچک مشخص می‌شود (Maassoumi, 2003, 2005). در رده‌بندی‌های گذشته دو گونه *A. alopecias* و *A. alopecurus* به دلیل دارا بودن گل آذین استوانه‌ای به عنوان خویشاوند نزدیک در نظر گرفته شده‌اند (Goncharov et al., 1965؛ Maassoumi, 1995؛ Ranjbar et al., 2002). در حالی که یافته‌های حاضر به وضوح نشان می‌دهد که *A. alopecias* در شاخه‌ای جداگانه و با فاصله نسبت به *A. alopecurus* قرار می‌گیرد. وجود دمگل آذین صفتی است که یکنواختی پایینی را نشان می‌دهد (CI=0.50).

وجود براکتول صفتی است که هیچ گونه یکنواختی نشان نمی‌دهد (CI=1.00). تباری متشکل از چهار گونه: *A. meridionalis*، *A. kirrindicus*، *A. echinops* و *A. obtusifolius* در داشتن صفت منحصر به فرد کاسه براکتول دار، به عنوان سین آپومورفی، مشخص می‌شود (شکل ۵). از میان صفات بررسی شده، این تنها صفتی است که هیچ گونه یکنواختی نشان نمی‌دهد و ارزش بالای این صفت را در رده‌بندی بخشه *Alopecuroidei* مشخص می‌کند. در مطالعات Goncharov و همکاران (۱۹۶۵) این چهار گونه به عنوان زیربخش *Bibracteolati* و در بررسی‌های Maassoumi (۱۹۹۵)

داخل کاسه، با نتایج حاصل از داده‌های مولکولی انطباق ندارد و مصنوعی بودن این صفت را در رده بندی بخشه *Alopecuroidei* نشان می‌دهد.

در اغلب گونه‌های بخشه *Alopecuroidei* گل آذین کروی یا تخم‌مرغی است. در پنج گونه: *A. alopecias*، *A. tawilicus*، *A. dictyolobus*، *A. alopecurus* و *A. victoriae* بازگشت به حالت نیایی با استوانه‌ای شدن گل آذین دیده می‌شود (شکل ۲). صفت شکل گل آذین شاخص سازگاری نسبتاً پایینی را نشان می‌دهد (CI=0.25) که نشان‌دهنده یکنواختی بالای این صفت است. گل آذین متراکم صفتی نیایی است که در اغلب اعضای بخشه *Alopecuroidei* و نیای مشترک آنها دیده می‌شود. گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* گل آذین تَنک را نشان می‌دهند (شکل ۳). مطالعه حاضر بیانگر مصنوعی بودن رده‌بندی Agerer و Agerer-Kirchhoff (۱۹۷۷) است که گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. phlomoides* و *A. tawilicus* را به دلیل کشیده و تَنک بودن گل آذین به بخشه *Laxiflori* (لکتوتیپ: *A. dictyolobus*) منتقل کرده بودند. Ranjbar و همکاران (۲۰۰۲) به دلیل وجود گل آذین متراکم در *A. phlomoides*، این گونه را به بخشه *Alopecuroidei* منتقل نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی که گونه‌های *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* را از *Alopecuroidei* جدا می‌کند، علاوه بر تَنک بودن گل آذین، محبوس بودن میوه رسیده درون کاسبرگ‌ها است. Agerer-Kirchhoff (۱۹۷۶) به دلیل شباهت‌هایی از جمله: وجود جام زردرنگ، میوه دوحجره‌ای و کاسه متورم در زمان میوه‌دهی گونه‌های

رده‌بندی‌های قبلی بخشه *Alopecuroidei* نشان می‌دهد. فقدان پراکتئول و شکل تخمدان صفاتی هستند که با تبارزایی حاصل از cpDNA *matK* مطابقت دارد. وجود دمگل آذین، صفتی است که دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* را به سایر اعضای *Alopecuroidei* نزدیک می‌کند. صفت تنک بودن گل آذین، گونه *A. victoriae* را به دو گونه *A. dictyolobus* و *A. tawilicus* شبیه می‌کند. سایر صفات ذکر شده به غیر از تنک بودن گل آذین، آن را به بخشه *Alopecuroidei* نزدیک می‌کند.

### سپاسگزاری

نگارنده از اساتید گرانقدر آقای دکتر علی اصغر معصومی و آقای دکتر شاهرخ کاظم‌پور اوصالو به خاطر راهنمایی‌های ارزنده در انجام پژوهش حاضر و همچنین فراهم نمودن زمینه برای استفاده از هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع و آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی دانشگاه تربیت مدرس تهران صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می‌نماید.

به عنوان گروه گونه‌ای *Obtusifolius* و در تحقیقات Ranjbar و همکاران (۲۰۰۲) تحت عنوان گروه گونه‌ای *Kirrindicus* شناخته شده است و بررسی‌های مولکولی Javanmardi و همکاران (۲۰۱۲a) تک‌تباری این زیربخش و گروه‌های گونه‌ای را تأیید نموده است.

صفت شکل تخمدان شاخص سازگاری برابر با ۰/۵ را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده جورگرایی پایین این صفت است (شکل ۶). گونه‌های *A. dictyolobus*، *A. tawilicus* و *A. victoriae* همراه با هفت گونه دیگر از بخشه *Alopecuroidei* تخمدان دوکی را نشان می‌دهند. این ویژگی ریخت‌شناسی می‌تواند تأییدکننده و منطبق با داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matK* باشد که این سه گونه را در میان بخشه *Alopecuroidei* نشان می‌دهد.

### جمع‌بندی

صفت وضعیت نیام داخل کاسه و صفات تراکم گل آذین و شکل گل آذین با نتایج حاصل از داده‌های مولکولی انطباق ندارد و مصنوعی بودن این صفات را در

### منابع

- Agerer-Kirchhoff, C. (1976) Revision von *Astragalus* L. sect. *Astragalus* (Leguminosae). Boissiera 25: 1-197.
- Agerer-Kirchhoff, C. and Agerer, R. (1977) Eine neue sektion der Gattung *Astragalus* L.: *Laxiflori* Agerer-Kirchhoff. Mitteilungen (aus) der Botanischen. Staatssamml. Munchen B: 203-234.
- Agerer-Kirchhoff, C. and Podlech, D. (1974) Eine neue und interessante *Astragalus* art aus der Turkei. Mitteilungen (aus) der Botanischen. Staatssamml. Munchen 11: 431-436.
- Asgari Nematian, M., Atri, M. and Chehregani Rad, A. (2010) Chemical variation of *Astragalus verus* Olivier (Fabaceae) according to flavonoid pattern in the West of Iran. Iranian Journal of Plant Biology 2(2): 67-80 (in Persian).
- Becht, R. (1978) Revision der sektion *Alopecuroidei* DC. der Gattung *Astragalus*. Phanerogamarum Monographiae X. Cramer, Vaduz.
- Chamberlain, D. F. and Matthews, V. A. (1970) Genus *Astragalus*. In: Flora of Turkey and the east

- Aegean Islands (Ed. Davis, P. H.) 3: 49-254. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Chaudhary, L. B., Rana, T. S. and Anand, K. K. (2008) Current status of the systematics of *Astragalus* L. (Fabaceae) with special reference to the Himalayan species in India. *Taiwania* 53(4): 338-355.
- Goncharov, N. F., Borisova, A. G., Gorshkova, S. G., Popov, M. G. and Vasilchenko, I. T. (1965) *Astragalus*. In: Flora of the USSR (Eds. Komarov, V. L. and Shishkin, B. K.) 12: 1-918. Israel Program for Scientific Translations/Smithsonian Institution and the National Science Foundation, Jerusalem/Washington.
- Hu, J. M., Lavin, M., Wojciechowski M. F. and Sanderson, M. J. (2000) Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on *matK* sequences, and implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany* 87: 418-430.
- Javanmardi, F., Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A. and Nejdassattari, T. (2012a) Phylogeny of *Astragalus* sect. *Alopecuroidei* based on the combined nrDNA ITS and morphology. *Rostaniha* 13 (2): 115-125.
- Javanmardi, F., Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A. and Nejdassattari, T. (2012b) Molecular phylogeny of *Astragalus* section *Alopecuroidei* (Fabaceae) and its allies based on nrDNA ITS and three cpDNAs, *matK*, *trnT-trnY* and *trnH-psbA* sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* 45: 171-178.
- Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A. and Murakami, N. (2003) Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences. *Plant Systematics and Evolution* 242: 1-32.
- Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A. and Murakami, N. (2005) Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia* 57: 367-381.
- Lock, J. M. and Schrier, B. D. (2005) The tribe Galegeae. In: Legumes of the world (Eds. Lewis, G., Schrier, B. D., Mackinder, B. and Lock, J. M.) 475-487. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Lock, J. M. and Simpson, K. (1991) Legumes of West Asia, a check list. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Maassoumi, A. A. (1986) *Astragalus* L.. vol. 1., Annuals. Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran (in Persian).
- Maassoumi, A. A. (1995) The Genus *Astragalus* in Iran. vol. 3., Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran (in Persian).
- Maassoumi, A. A. (1998) *Astragalus* in the Old World, Check-list. Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran.
- Maassoumi, A. A. (2003) Flora of Iran, Papilionaceae (*Astragalus* I). vol. 3. Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran (in Persian).
- Maassoumi, A. A. (2005) The genus *Astragalus* in Iran. vol. 3., Research Institute of Forests and Rangeland, Tehran (in Persian).
- Maassoumi, A. A. and Ranjbar, M. M. (1996) Notes on the genus *Astragalus* sect. *Alopecuroidei* DC. in Iran. *Iranian Journal of Botany* 7(1): 39-43.
- Maddison, D. R. and Maddison, W. P. (2010) MacClade4: Analysis of phylogeny and character evolution. version 4.03, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Maddison, W. P., Donoghue, M. J. and Maddison, D. R. (1984) Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology* 33: 83-103.
- Neuhaus, H. and Link, G. (1987) The chloroplast tRNA Lys (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*)

- contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Current Genetics* 11: 251-257.
- Nuin, P. (2005) MrMTgui 1.0 (version 1.6). Retrieved from <http://www.genedrift.org/mtgui.php>. On: 21 October 2012.
- Nylander, J. A. A. (2004) MrModeltest v2. Evolutionary Biology Center, Uppsala University. Retrieved from <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2>. On: 4 September 2013.
- Podlech, D. (1999) Papilionaceae III: *Astragalus*. In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) 174: 1-350. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz.
- Polhill, R. M. (1981) Galegeae. In: *Advances in legume systematic* (Eds. Polhill, R. M. and Raven, P. H.) 1: 371-374. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Posada, D. and Buckley, T. (2004) Model selection and Model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio rates. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Ranjbar, M. and Karamian, R. (2002) *Astragalus* sect. *Astragalus* (Fabaceae) in Iran, complementary notes with a key to the species. *Nordic Journal of Botany* 22: 177-181.
- Ranjbar, M. and Karamian, R. (2003) *Astragalus neo-assadianus* (Fabaceae), a new species in sect. *Alopecuroidei* from Iran. *Botanical Journal of the Linnean Society* 143: 197-200.
- Ranjbar, M. and Karamian, R. and Enayat Akmal, A. (2010) Biosystematic study of 4 populations of *Astragalus macrostachys* DC. of *Astragalus* sect. *Malacothrix* Bunge in Iran. *Iranian Journal of Plant Biology* 2(6): 39-54 (in Persian).
- Ranjbar, M., Maassoumi, A. A. and Podlech, D. (2002) *Astragalus* sect. *Alopecuroidei* (Fabaceae) in Iran, complementary notes with a key to the species. *Willdenowia* 32: 85-91.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1-210.
- Sanderson, M. J. (1989) Confidence limits on phylogenies: The bootstrap revisited. *Cladistics* 5:113-130.
- Sanderson, M. J. and Hufford, L. (1996) Homoplasy, the recurrence of similarity in evolution. Academic Press, San Diego.
- Steele, K. P. and Wojciechowski, M. F. (2003) Phylogenetic analyses of tribes Trifolieae and Viciae, based on sequences of the plastid gene *matK* (Papilionoideae: Leguminosae). In: *Advances in legume systematics* (Eds. Klitgaard, B. B. and Bruneau, A.) 10: 355-370. Higher Level Systematics, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). version 4.0b10. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M. and Sanderson, M. J. (2004) A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 9(11): 1846-1862.

## القای پاسخ‌های دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلولی کتان سفید (*Linum album*) توسط امواج فراصوت

ارمغان عابدزاده نیشابوری<sup>۱</sup> و آیت‌اله رضایی<sup>۲\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

<sup>۲</sup> گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

### چکیده

امواج فراصوت با انرژی پایین به عنوان یک ابزار فیزیکی برای تحریک سیستم‌های زنده در پزشکی و بیوتکنولوژی مورد توجه قرار دارد. در مطالعه حاضر، تأثیر امواج فراصوت بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و تولید پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی کتان سفید (*Linum album*) بررسی شد. امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان ۵ وات بر سانتی‌متر مکعب، به کشت‌های سلولی در قالب آزمایش وابسته به زمان با ۳ تکرار تیمار شد و سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار جمع‌آوری شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی عبارت بودند از: رشد سلولی، پروتئین کل، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، فنل‌ها، فلاونوئیدها، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیلایز و پودوفیلوتوکسین. نتایج نشان داد که رشد سلول‌ها تحت تأثیر امواج فراصوت کاهش معنی‌داری نشان داد اما تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین سلول‌ها صورت نگرفت. مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیلایز در سلول‌ها نسبت به شاهد تحت اثر امواج فراصوت افزایش یافت. امواج فراصوت همچنین باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی، محتوای فلاونوئیدی و پودوفیلوتوکسین در سلول‌های تیمار شده گردید. بیشترین مقدار پودوفیلوتوکسین در کشت‌های تیمار شده پس از ۷۲ ساعت با مقدار ۲۶۸/۹ میکروگرم بر گرم وزن خشک به دست آمد که ۲/۷ برابر کشت شاهد بود. به نظر می‌رسد امواج فراصوت با تحریک سلول‌ها و القای پاسخ‌های دفاعی و متابولیسم ثانویه باعث افزایش مقدار پودوفیلوتوکسین در سلول‌ها گردید.

**واژه‌های کلیدی:** امواج فراصوت، پودوفیلوتوکسین، کتان سفید، کشت سلولی

## مقدمه

ترکیبات مفید کشت‌های سلول گیاهی غالباً متابولیت‌های ثانویه هستند که معمولاً به مقدار بسیار اندک در سلول‌های گیاهی تیمار نشده تجمع می‌یابند. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخ‌های دفاعی است که توسط الیستورها القا و فعال می‌شوند. بنابراین تیمار سلول‌های گیاهی با الیستورهای زیستی و غیرزیستی یکی از راهکارهای سودمند برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی است (Dornenburg and Knorr, 1995). الیستورهایی که غالباً در مطالعات گذشته مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل کربوهیدرات‌های قارچی، عصاره مخمر، متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید و کیتوزان بوده است (Dornenburg and Knorr, 1995).

مطالعات نشان داده است که امواج فراصوت (Ultrasound; US) با شدت زیاد برای ترکیبات زیستی مخرب بوده، غشای سلول‌ها را تخریب کرده، مولکول‌هایی زیستی نظیر آنزیم‌ها و DNA را غیرفعال می‌سازد (Frizzell, 1988). از سوی دیگر، نشان داده شده است که US با شدت و انرژی کم، طیفی از آثار زیستی غیرگشونده دارد که از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. یکی از گسترده‌ترین آثار غیرمخرب US بر سلول‌های زنده، افزایش در نفوذپذیری غشا است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فرآورده‌های درون سلولی توسط سلول‌ها را افزایش می‌دهد. علاوه بر افزایش نفوذپذیری غشای سلولی، US به عنوان محرک واکنش‌های آنزیمی، تبدیلات زیستی توسط میکروب‌ها، بیوسنتز در سلول‌های جانوری و سلول‌ها و پروتوپلاست‌های گیاهی استفاده

شده است (Joersbo؛ Edmonds and Ross, 1988) (Wood *et al.*, 1997؛ and Brunstedt, 1992). پیرامون تأثیرات تحریک‌کنندگی US بر جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه‌ها و ریشه‌چه در گیاهان در گذشته مطالعات متعددی انجام شده است (Gordon, 1971). به تازگی، مطالعات پراکنده‌ای در مورد آثار زیستی US در کشت سلول‌های گیاهی انجام شده است اما در مورد اثر تحریک‌کنندگی US در سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی اطلاعات اندکی در دست است. افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی توسط امواج US با انرژی کم، گزارش شده است (Wang *et al.*, 2006؛ Wu and Lin, 2002)؛ (Safari *et al.*, 2012). نشان داده شده است که افزایش در بیوسنتز متابولیت ثانویه بیشتر ناشی از القای فعالیت فیزیولوژیکی سلول‌ها توسط US است تا تأثیر انتقال جرم. این تأثیر ویژه US بر تولید متابولیت ثانویه در کشت‌های سلول گیاهی از اهمیت‌های بنیادی و کاربردی برخوردار است و US به عنوان یک شبه‌الیستور غیرزیستی در القای واکنش‌های دفاعی گیاه نظیر قهوه‌ای شدن آنزیمی، انفجار اکسیداتیو و ورود کلسیم از طریق غشا مورد توجه قرار گرفته است (Wu and Ge, 2004؛ Wu and Lin, 2002).

گیاه کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) یکی از گونه‌های بومی ایران است و به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات لیگنانی به ویژه پودوفیلوتوکسین، در زمره گیاهان دارویی مهم قرار می‌گیرد. پودوفیلوتوکسین در میان لیگنان‌ها به این علت که برای تولید سه ماده ضد سرطان مهم به نام‌های etoposide، teniposide و etoposide به کار می‌رود از



هفته واکشت گردید. برای دستیابی به لاین سلولی با رشد همگن، فرآیند واکشت چندین بار تکرار گردید.

**تیمار سلول‌ها با امواج US:** برای به کارگیری امواج US در دامنه‌های کیلوهرتز پایین، از یک سیستم حمام اولتراسونیک (FALC Instruments)، ساخت ایتالیا) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و پهنای باند ۳۲۰ هرتز به صورت پیوسته مطابق روش Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. برای ارزیابی اثر امواج US و دستیابی به بهترین زمان تابش، ابتدا آزمونی مقدماتی صورت گرفت. امواج US با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان ۵ وات بر سانتی متر مربع به مدت زمان‌های ۲، ۴ و ۸ دقیقه در روز هفتم واکشت، به سلول‌ها در محیط کشت تعلیقی تیمار شد (فرکانس مورد نظر و دامنه مدت زمان تیمار شده با توجه به مطالعات قبلی انتخاب گردید و روز هفتم پس از واکشت که منطبق با اواسط فاز خطی رشد سلولی در کشت‌ها بود برای اعمال تیمار انتخاب شد). نتایج حاصل از آزمایش مقدماتی نشان داد که بهترین تیمار برای امواج US با توجه به میزان رشد، زنده‌مانی سلولی و تولید پودوفیلوتوکسین، مدت زمان ۲ دقیقه بود. بنابراین، در ادامه این مدت زمان تابش انتخاب گردید و در روز هفتم پس از واکشت به کشت‌های سلولی در قالب آزمایش وابسته به زمان با ۳ تکرار تیمار شد و سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار جمع‌آوری شدند. سلول‌های جمع‌آوری شده توسط ازت مایع منجمد و تثبیت شدند، سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند تا برای بررسی صفات مورد استفاده قرار گیرند. سطح آب درون حمام اولتراسونیک حدوداً یک سانتی متر بالاتر از سطح

اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در ارتباط با تأثیر عوامل فیزیکی از جمله US بر سلول‌های گیاه کتان سفید تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است، اگر چه تأثیر الیستورهای شیمیایی و زیستی بر تولید متابولیت‌های ثانویه و از جمله تولید پودوفیلوتوکسین در کشت‌های سلولی آن گزارش شده است (Furden *et al.*, 2005؛ Esmaeilzadeh Bahabadi *et al.*, 2008؛ Baldi *et al.*, 2012). بنابراین، در پژوهش حاضر، سعی بر آن است تا با دست‌ورزی سلول‌های گیاه *Linum album* در محیط کشت تعلیقی توسط امواج US، رشد و مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه و از جمله پودوفیلوتوکسین و همچنین سازوکارهای مربوط به آن بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

**راه‌اندازی کشت سلولی:** برای تولید گیاهچه، بذره‌های کتان سفید جمع‌آوری شده از منطقه سوهانک تهران در محیط پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت داده شدند. سپس، از ساقه‌چه گیاهک‌های حاصل به عنوان قطعات جداکشت استفاده شد. کالوس‌های به دست آمده در محیط کشت جامد MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید و ۰/۴ میلی گرم در لیتر کینتین، برای راه‌اندازی کشت سلولی تعلیقی استفاده شد. برای راه‌اندازی کشت تعلیقی حدود ۲ گرم کالوس نرم و سفید به دست آمده از قطعات جداکشت ساقه، به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت MS با ترکیبات هورمونی (NAA ۲ میلی گرم در لیتر و کینتین ۰/۴ میلی گرم در لیتر) بدون آگار اضافه شد و با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی روی شیکر نگهداری شد و هر ۲

سانتیگراد قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر جذب آنها اندازه‌گیری گردید. مقدار MDA توسط اسپکتروفتومتر به کمک ضریب خاموشی ۱۵۵ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر محاسبه گردید (De Vos *et al.*, 1991).

**تعیین مقدار پراکسید هیدروژن:** مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) سنجیده شد. بدین منظور، ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده روی یخ با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار، با اسیدیته برابر با ۷) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار افزوده و جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید.

**اندازه‌گیری ترکیبات فنلی:** برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، ۲۰۰ میلی‌گرم سلول منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر محلول اتانول اسیدی شامل اتانول: استیک اسید به نسبت ۱:۹۹ در هاون ساییده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات به آن افزوده شد و پس از به هم زدن شدید، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (اتیل استات به علت غیرقطبی بودن و داشتن چگالی کمتر، از فاز اتانول و آب سلولی سبک‌تر است و با سانتریفیوژ جدا شد). فاز رویی که اتیل استات بود، جداسازی و تبخیر شد. سپس، باقیمانده در ۳ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد (v/v) حل گردید. مقدار

محیط کشت درون ارلن‌ها بود و دما نیز طی تیماردهی، ۲۵±۰/۵ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد.

**اندازه‌گیری رشد سلولی:** رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش در وزن تر سلول‌ها در ظروف کشت تعیین شد. بدین منظور، سلول‌ها توسط نایلون مش (۴۲ میکرومولار) به کمک پمپ خلأ از محیط کشت جدا و برای تعیین وزن تر بلافاصله توزین شدند.

**اندازه‌گیری مقدار پروتئین:** غلظت پروتئین نمونه‌ها با روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد. برای تعیین غلظت پروتئین‌های نمونه‌ها، از هر عصاره پروتئینی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در لوله آزمایش ریخته و یک میلی‌لیتر محلول بردفورد به آن افزوده شد. محتویات لوله‌ها هم زده شد و پس از گذشت ۵ دقیقه، مقدار جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل Lambda 650، شرکت PerkinElmer، آمریکا) سنجیده شد، سپس با استفاده از نمودار استاندارد آلومین سرم گاوی (۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) غلظت پروتئین نمونه‌ها به دست آمد.

**تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی:** مقدار آسیب به غشاها با اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تعیین شد. بدین منظور، ۲۰۰ میلی‌گرم از سلول‌های منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد ساییده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (مدل 3-30KS، شرکت Sigma، آلمان) شدند. به یک میلی‌لیتر از نمونه‌های صاف شده، یک میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۲۵ درصد اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه

در یک میلی‌لیتر متانول حل شد. برای اندازه‌گیری مقدار پودوفیلوتوکسین از روش محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگراف استاندارد پودوفیلوتوکسین (سیگما) حاصل از HPLC (شرکت Knauer، آلمان) استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع C18-ODS3 با طول ۲۵۰ و قطر ۴/۶ میلی‌متر بود و جذب پودوفیلوتوکسین در طول موج ۲۹۰ نانومتر بررسی شد.

#### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت پلی فنل

**اکسیداز (PPO):** برای سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته برابر با ۶/۸) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده و سپس نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت PPO از روش Dornenburg و Knorr (۱۹۹۷) استفاده شد. بدین ترتیب که مخلوطی شامل ۰/۵ میلی‌لیتر ۴-متیل کاتکول ۰/۰۲ مولار تازه تهیه شده، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (اسیدیته برابر با ۶/۸) و ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره حاوی آنزیم تهیه و جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم به صورت افزایش جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان گردید.

#### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت گایاکول

**پراکسیداز (PO):** در حضور پراکسید هیدروژن، پراکسیداز، گایاکول را به تترایاکول که یک فرآورده نارنجی‌رنگ است، تبدیل می‌کند (ضریب خاموشی ۲۵/۲ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر). برای سنجش

کل ترکیبات فنلی با اندازه‌گیری جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از استاندارد سالیسیلیک اسید تعیین شد.

#### اندازه‌گیری فلاونوئید کل: به منظور سنجش

فلاونوئید کل، ۲۰۰ میلی‌گرم توده سلولی منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر محلول متانول اسیدی شامل متانول: استیک اسید به نسبت ۱:۹۹ در هاون ساییده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از همگنای حاصل پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد کلرید آلومینیوم ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) مخلوط و به شدت به هم زده شد. جذب آن پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در طول موج ۳۶۷/۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد و مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد فلاونوئید آپیژنین محاسبه گردید (Djeridane *et al.*, 2006).

#### استخراج و اندازه‌گیری مقدار

**پودوفیلوتوکسین:** برای استخراج و اندازه‌گیری مقدار پودوفیلوتوکسین از روش Esmailzadeh Bahabadi و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. بدین ترتیب که به ۵۰ میلی‌گرم وزن خشک سلول، یک میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد افزوده و سپس کاملاً ساییده و همگن شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفته و سانتریفیوژ شد. محلول حاصل به لوله جدید منتقل و بخش متانولی تبخیر شد. به عصاره آبی باقیمانده، یک میلی‌لیتر آب (جهت جداسازی ترکیبات قطبی) و یک میلی‌لیتر اتیل استات (جهت جداسازی ترکیبات غیرقطبی از جمله پودوفیلوتوکسین) افزوده شد و سانتریفیوژ گردید. سپس، فاز اتیل استات به لوله جدید منتقل و تبخیر شد. در پایان، رسوب خشک شده

شد. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار متوقف شد و فرآورده آن به کمک اتیل استات استخراج شد. اتیل استات تبخیر و باقیمانده در ۳ میلی لیتر سود ۰/۵ مولار حل شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد سینامیک اسید توسط اسپکتروفتومتر تعیین شد. یک واحد از فعالیت PAL برابر با یک میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در دقیقه است.

**تحلیل آماری:** آزمایش‌ها با سه تکرار انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

### نتایج و بحث

**رشد سلولی و محتوای پروتئین:** نتایج نشان داد که با گذشت زمان رشد سلول‌ها در کشت‌های شاهد افزایش یافت و پس از گذشت ۷۲ ساعت مقدار رشد به طور معنی‌داری نسبت به زمان‌های قبل افزایش نشان داد و به مقدار ۲۶۱ گرم در لیتر رسید. رشد سلول‌ها تحت تأثیر امواج US قرار گرفت و نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. تغییرات مقدار پروتئین کل در هر دو نوع کشت سلولی با گذشت زمان معنی‌دار نبود. مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده در کشت‌های تیمار شده در پایان دوره کشت نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱).

### مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تولید

**پراکسید هیدروژن:** تیمار با امواج US باعث افزایش معنی‌دار در پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کشت‌های شاهد گردید.

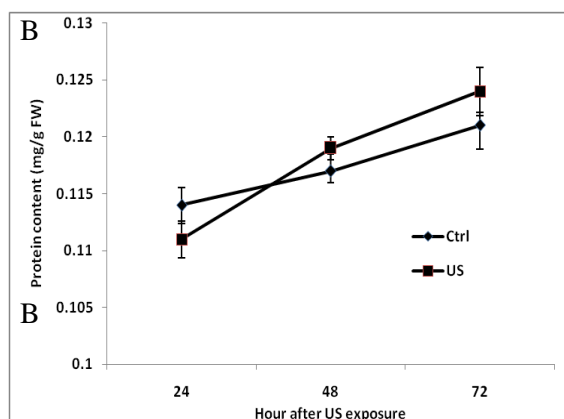
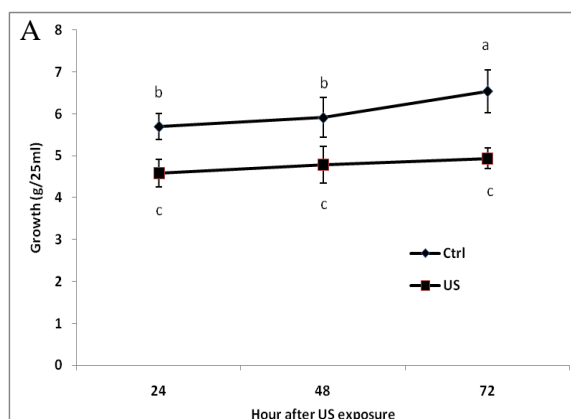
فعالیت PO نیز از روش Knorr و Dornenburg (۱۹۹۷) استفاده شد. برای استخراج پراکسیداز محلول، ۲۰۰ میلی گرم توده سلولی منجمد شده در بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار (اسیدیته برابر با ۶/۱) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده، سپس نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۶۰ میلی مولار (اسیدیته برابر با ۶/۱)، گایاکول ۲۸ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۵ میلی مولار بود. جذب آن در طول یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد و فعالیت آنزیم به صورت پراکسیداسیون یک میکرومول از گایاکول در دقیقه در گرم وزن تر نسبت به میلی گرم پروتئین عصاره بیان گردید.

### استخراج و اندازه‌گیری فعالیت فنیل آلانین

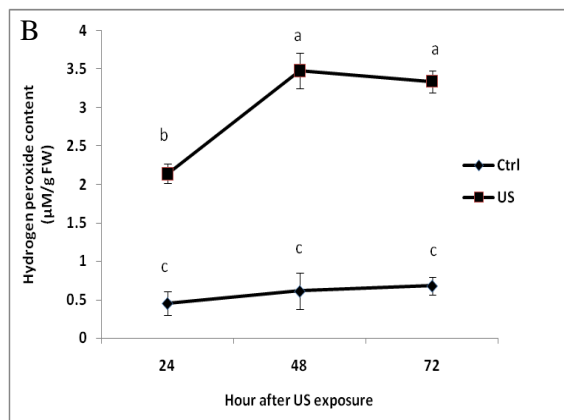
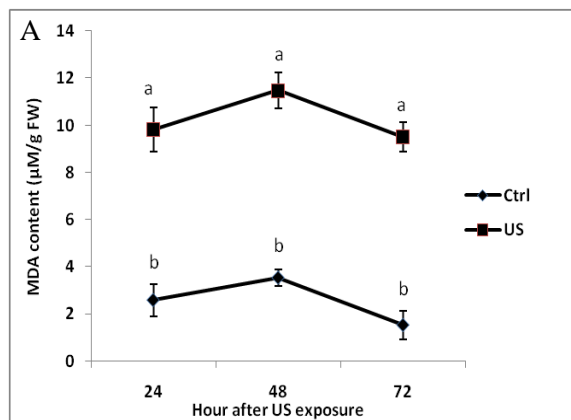
**آمونیاک‌لیاز (PAL):** برای استخراج PAL، ۲۰۰ میلی گرم سلول منجمد شده با ۶/۵ میلی لیتر بافر تریس-HCl (۵۰ میلی مولار، اسیدیته برابر با ۸/۸) حاوی بتا-مرکاپتواتانول (۱۵ میلی مولار) در هاون روی یخ به مدت ۲ دقیقه ساییده شد. سپس، نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) شدند و مایع رویی برای سنجش فعالیت PAL مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت PAL بر اساس مقدار تولید سینامیک اسید با روش Ochoa-Alejo و Gmez-Peralta (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که مخلوط شامل یک میلی لیتر از بافر استخراج، ۰/۵ میلی لیتر از L-فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر از آب دیونیزه و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره حاوی آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه

معنی‌داری در کشت‌های تیمار شده صورت گرفت. این تغییر تولید، در مقایسه با کشت‌های شاهد نیز افزایش معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار آن در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد (شکل ۲).

در هر دو کشت شاهد و تیمار شده، طی زمان آزمایش، تغییرات پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در سلول‌ها معنی‌دار نبود و ثابت ماند. تغییر در تولید پراکسید هیدروژن با گذشت زمان تحت تأثیر امواج US به طور



شکل ۱- A) اثر امواج US بر رشد و B) محتوای پروتئین سلول‌ها در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

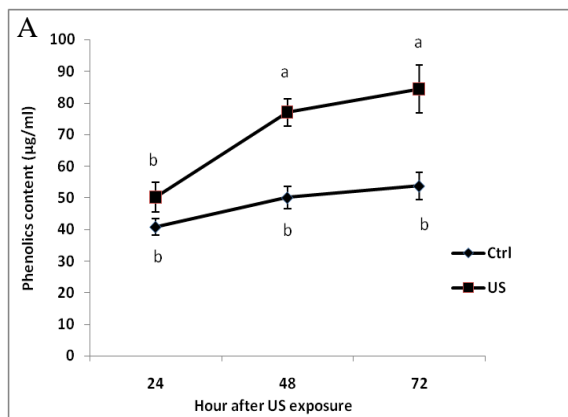


شکل ۲- A) اثر تیمار امواج US بر مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و B) تولید پراکسید هیدروژن در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

و بیشترین مقدار در زمان ۷۲ ساعت پس از انجام تیمار به دست آمد. تفاوت معنی‌داری بین کشت‌های تیمار شده و شاهد به ویژه پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. در کشت‌های شاهد با گذشت زمان، بر مقدار ترکیبات

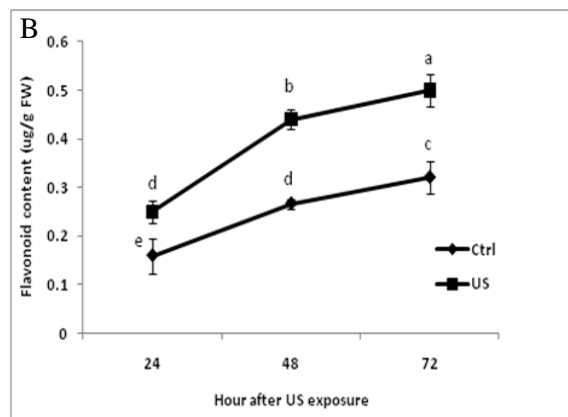
**تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی: تیمار امواج US باعث القای تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کشت‌های سلولی گردید. به طوری که با گذشت زمان، به تدریج به طور معنی‌داری بر میزان تولید آنها اضافه شد**

ساعت در هر دو نوع کشت پس از انجام تیمار به دست آمد. در کشت‌های تیمار شده، تفاوت معنی‌داری بین کلیه زمان‌های نمونه‌برداری شده در این مورد مشاهده شد. اما در کشت‌های شاهد فقط پس از گذشت ۷۲ ساعت، افزایش تولید پودوفیلوتوکسین معنی‌دار بود (شکل ۴). در مجموع، بیشترین مقدار پودوفیلوتوکسین در کشت‌های تیمار شده پس از ۷۲ ساعت با مقدار ۲۶۸/۹ میکروگرم بر گرم وزن خشک به دست آمد که ۲/۷ برابر کشت شاهد طی همین مدت زمان بود.

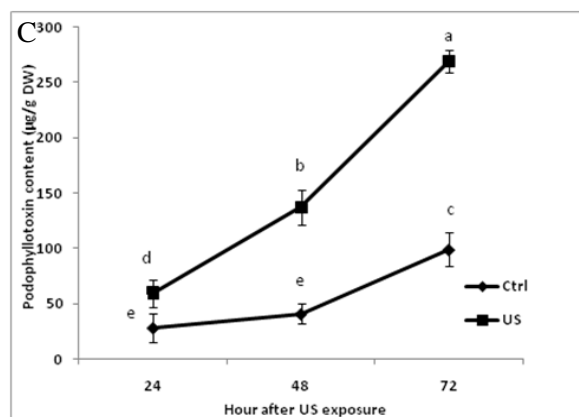


فنی تا حدودی افزوده شد اما تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های نمونه‌برداری مشاهده نشد. اما در مورد ترکیبات فلاونوئیدی با گذشت زمان در کشت‌های شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳).

**تولید پودوفیلوتوکسین:** شکل ۴ روند تغییر در تولید پودوفیلوتوکسین در طول زمان و تحت تأثیر امواج US در کشت‌های سلولی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان به تدریج بر میزان تولید آن افزوده شد و بیشترین مقدار پس از ۷۲



شکل ۳- اثر تیمار امواج US بر (A) تولید ترکیبات فنی و (B) فلاونوئیدی در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

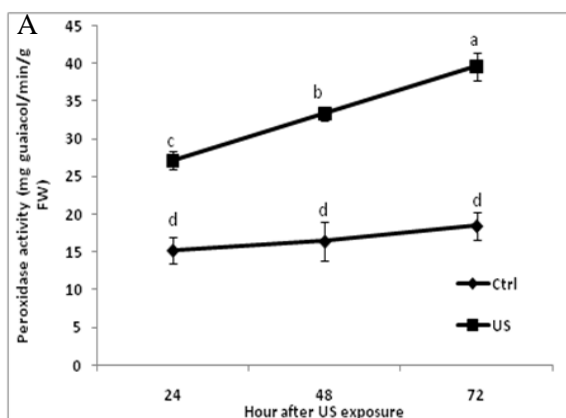


شکل ۴- اثر تیمار امواج US بر تولید پودوفیلوتوکسین در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

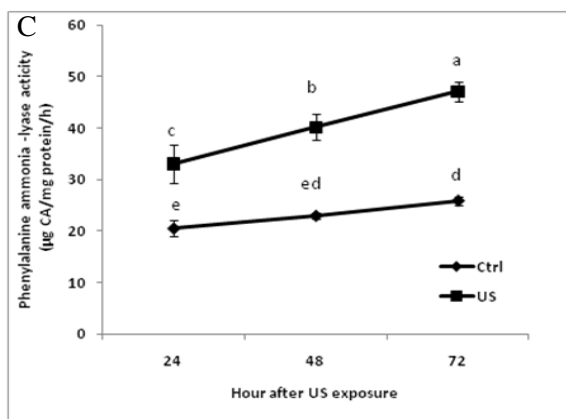
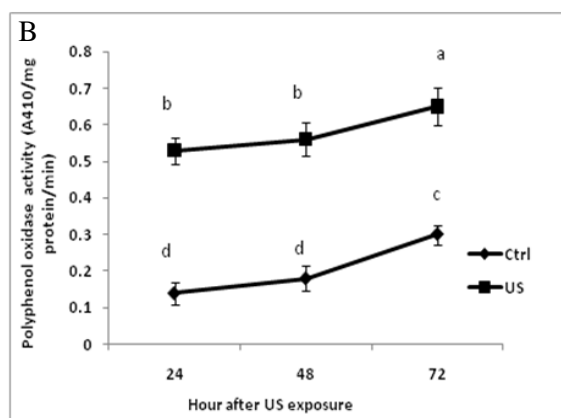
قرار گرفت و باعث القای فعالیت آنها در سلول‌ها شد. به طوری که با گذشت زمان به تدریج بر میزان فعالیت آنها

**فعالیت آنزیم‌های دفاعی:** همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم‌ها تحت تأثیر امواج US

نمونه‌برداری مشاهده نشد. اما بر فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و PAL در کشت‌های شاهد با گذشت زمان افزوده شد و تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های نمونه‌برداری ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده گردید. به طور کلی، روند تغییرات در فعالیت هر سه آنزیم بررسی شده در طول زمان شباهت زیادی با یکدیگر نشان داد.



به طور معنی‌دار افزوده شد و بیشترین فعالیت در زمان ۷۲ ساعت پس از انجام تیمار مشاهده گردید. از نظر فعالیت آنزیم‌های بررسی شده، تفاوت معنی‌داری بین کشت‌های تیمار شده و شاهد پس از گذشت زمان‌های مورد نظر مشاهده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز، در کشت‌های شاهد با گذشت زمان تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های



شکل ۵- اثر تیمار امواج US بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (A)، پلی فنل اکسیداز (B) و فنیل آلانین آمونیا لیااز (C) در کشت سلولی کتان سفید. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار است. حروف غیر یکسان نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P \leq 0.05$  است.

گردید. از سوی دیگر، تابش کوتاه مدت US، تأثیر معنی‌داری بر تولید زی‌توده در کشت سلولی سرخدار چینی (*T. chinensis*) نداشت (Wu and Lin, 2003). به کارگیری US در مورد کشت‌های تعلیقی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیک پراانرژی نظیر حفره‌زایی آکوستیک و جریان‌های میکروسکوپی می‌شود که به آسیب‌های مکانیکی و تنش برشی (shear stress)

## بحث

گزارش شده است که افزایش مدت زمان تیمار سلول‌های برنج با امواج US، همراه با کاهش رشد و زنده‌مانی سلول‌ها است (Liu et al., 2003). Wang و همکاران (۲۰۰۶) نیز مشاهده نمودند که تابش امواج US به سلول‌های گیاه سرخدار (*Taxus yunnanensis*) به کاهش محسوس درصد زنده‌مانی سلول‌ها منجر

هیدروژن به عنوان یکی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) همزمان با کاهش رشد سلولی، که در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید، نشان می‌دهد که ممکن است نوعی اختلال یا تغییر فیزیکی در دیواره یا غشای پلاسمایی نظیر تخریب یا تغییر شکل در اثر برخورد امواج US به سطح سلول به وجود آمده باشد. از نخستین واکنش‌های سلول به تنش که طی چند دقیقه پس از القای تنش صورت می‌گیرد، تولید و آزادسازی ROSها نظیر رادیکال سوپر اکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، رادیکال هیدروکسیل ( $OH^{\cdot}$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) است. ROSها از عوامل مهم در تنش اکسیداتیو هستند که به طور قابل توجهی رشد سلول و متابولیسم ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین، ROSها اکسیدکننده‌های قوی هستند که می‌توانند آثار مخربی بر درشت‌مولکول‌های زیستی نظیر DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشا داشته باشند و از این طریق موجب تغییر ساختارهای سلول گردند (Banu et al., 2009).

در مورد آثار امواج US بر میزان فلاونوئید تولیدی اطلاعات ناچیزی وجود دارد، اما القای تولید ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تیمار امواج فراصوت و شرایط نامساعد و تنش‌زا و همچنین تحت تأثیر الیستورها مشاهده شده است. در راستای نتایج پژوهش حاضر نشان داده شده است که US باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در بادام زمینی شد (Sales and Resurreccion, 2010). همچنین Wu و Lin (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که US باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در کشت سلولی جینسینگ گردید. Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش تولید ترکیبات فنلی در سلول‌های فندق تحت اثر امواج US را نشان داده‌اند.

سلول‌ها و تأثیر بر رشد آنها منتهی می‌گردد (Wu and Lin, 2003). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با گذشت زمان و تحت اثر امواج US، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئینی سلول‌های کتان سفید صورت نگرفت. در مورد تأثیر بیوسنتزی امواج US در سلول گزارش‌هایی وجود دارد. گرچه مشاهده شده است که امواج فراصوت با شدت پایین، بیوسنتز پروتئین‌ها را در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های چغندر قند افزایش داد (Joersbo and Brunstedt, 1990). گزارش مشابهی نیز در مورد سلول‌های جانوری گزارش گردیده است (Edmonds and Ross, 1988).

اطلاعات چندانی در زمینه تأثیر US بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشاهای سلول‌های گیاهی در دست نیست. در هماهنگی با نتایج به دست آمده، مشاهده شد که امواج US در کشت سلولی تعلیقی سرخدار چینی باعث القای پراکسیداسیون لیپیدها گردید (Wu and Ge, 2004). در مورد القای تولید پراکسید هیدروژن تحت تأثیر US، نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های Wang و همکاران (۲۰۰۶) هماهنگی نشان می‌دهد. آنها مشاهده کردند که تیمار سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) با US سبب افزایش تولید پراکسید هیدروژن گردید. Wu و Lin (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های جینسینگ در پاسخ به US افزایش یافت. افزون بر این، Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که امواج US با شدت کم، باعث القای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و افزایش تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های فندق شد. افزایش سطح MDA به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین پراکسید



Rezaei et al., Komaraiah et al., 2005, Ge, 2004  
2011, Safari et al., 2012).

گزارش شده است که الیسیتورهای شیمیایی و زیستی سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه و از جمله تولید پودوفیلوتوکسین در کشت‌های سلولی *Linum album* می‌شوند (Baldi et al., 2008؛ Furden et al., 2005). با توجه به این که امواج US با چنین الیسیتورهایی از نظر ماهیتی متفاوت هست، به نظر می‌رسد که امواج US نه فقط از طریق آثار فیزیکی بر سلول‌ها بلکه از طریق مسیرهای انتقال پیام موجب القای شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مرتبط با دفاع و متابولیسم ثانویه شده و باعث افزایش تولید پودوفیلوتوکسین گردیده است. در پژوهش حاضر مشاهده شد که به کارگیری امواج US، باعث القای متابولیسم ثانویه و افزایش ماده مؤثره مهم پودوفیلوتوکسین شد و به بیان دیگر، آثاری شبیه سایر الیسیتورها توسط US بر سلول‌ها اعمال گردید.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم PAL به طور معنی داری در پاسخ به تیمار US افزایش یافت. نتایج Lin و Wu (۲۰۰۲) مبنی بر این که US فعالیت PAL را در سلول‌های جینسینگ افزایش می‌دهد نیز در راستای نتایج پژوهش حاضر است. همچنین Wang و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر US در سلول‌های سرخدار (*T. yunnanensis*) افزایش یافت. آنزیم PAL با راه‌اندازی سنتز فنیل پروپانویدهای مختلف نقش مهمی در واکنش گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد، همچنین نشان داده شده است که الیسیتورهای قارچی، عوامل بیماری‌زا و ایجاد زخم به عنوان یک

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از جمله ترکیبات دفاعی هستند که هر دو محصول مسیر بیوستتری فنیل پروپانوییدی هستند. مطالعات متعدد، ارتباط مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داده‌اند (Cai et al., 2004). فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات اساساً به علت ویژگی احیاکنندگی آنها است که موجب می‌شود تا به عنوان عوامل احیا کننده، دهنده هیدروژن و خاموش کننده گونه‌های فعال اکسیژن نظیر  $H_2O_2$  عمل نمایند. القای تولید چنین ترکیباتی با توجه به افزایش میزان پراکسید هیدروژن و MDA در سلول‌ها در جهت محافظت از اجزای سلولی، اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نوکلئیک اسیدها است که توسط ROS‌ها مورد حمله قرار می‌گیرند، بنابراین پیشگیری از اختلالات متابولیک و سلولی منطقی به نظر می‌رسد (Martinez-Cayuela, 1995).

در پژوهش حاضر مشاهده شد که امواج US باعث افزایش معنی‌دار تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌ها نسبت به کشت‌های شاهد گردید. اگر چه در مورد تأثیر امواج US بر تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های کتان سفید اطلاعاتی وجود ندارد اما نشان داده شده است که تیمار کوتاه مدت سلول‌های گیاهی با US با انرژی کم، بیوستتر متابولیت‌های ثانویه ارزشمند نظیر ساپونین‌های جینسنوزید را در سلول‌های *Panax ginseng*، شیکونین‌ها را در سلول‌های *Lithospermum erythrorhizon* آنتراکینون را در *Morinda citrifolia* تاکسول را در سلول‌های فندق و تاکسوئیدها را در سرخدار چینی (*T. chinensis*) افزایش داد (Wu and Lin, 2002؛ Wu and Lin, 2002).

نسبت به تنش‌هایی مانند تنش مکانیکی US، القا شده است. معمولاً چنین پاسخ‌های آنزیمی و متابولیسمی در سلول‌های گیاهی تحت تأثیر تنش‌ها یا الیستورهای زیستی و غیرزیستی در پی سایر واکنش‌های دفاعی سریع، نظیر انفجار اکسیداتیو رخ می‌دهد (Koch *et al.*, 1998). شایان ذکر است که PO نیز همانند ترکیبات فنلی برای جلوگیری از تنش‌های اکسیداتیو مخرب در سلول‌های به عنوان آنتی‌اکسیدان گیاهی ایفای نقش می‌کند (Cai *et al.*, 2004). به طور کلی، القای فعالیت آنزیم‌های PAL، PPO و PO توسط امواج US که در ارتباط با متابولیسم ترکیبات فنلی هستند نشان می‌دهد که این امواج شرایط تنشی را برای سلول‌ها القا کرده و موجب تقویت سازوکارهای دفاعی شده است.

با توجه به این که دست‌ورزی کشت‌های سلولی تحت اثر US بسیار راحت و کم هزینه است، بنابراین امکان استفاده از آن در صنعت می‌تواند کمک زیادی به بالا بردن کارآیی تولید متابولیت‌ها از جمله پودوفیلوتوکسین نماید.

### سپاسگزاری

نگارندگان از جناب آقای دکتر حمید مقبلی و سرکار خانم دکتر سکینه سعیدی‌سار به خاطر همکاری بی‌دریغ در امر مشاوره و تکمیل این اثر، سپاسگزاری می‌نمایند.

محرک مکانیکی باعث القای فعالیت این آنزیم می‌شوند (Lawton and Lamb, 1987). به نظر می‌رسد که با توجه به نتایج به دست آمده تیمارهای اعمال شده به ویژه US با افزایش فعالیت PAL به تجمع ترکیبات فنلی و القای متابولیسم ثانویه منجر گردید.

فعالیت PPO توسط US نیز به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. PPO در سلول‌های گیاهی ترکیبات فنلی را اکسید کرده، آنها را به کینون‌ها تبدیل می‌کند. بنابراین، میزان واکنش به فعالیت PPO و میزان ترکیبات فنلی بستگی دارد. مشخص شده است که PPO و ترکیبات فنلی در سلول‌ها در بخش‌های مختلف نگهداری می‌شوند. ترکیبات فنلی در واکوئول‌ها و PPO به طور عمده به پلاست‌ها متصل است (Lee, 2000). اکسیداسیون فنل‌ها توسط PPO نیازمند تخریب یا نفوذپذیری بیشتر غشای تونوپلاست برای آزادسازی ترکیبات فنلی به سیتوسل است. بنابراین، به نظر می‌رسد افزایش فعالیت PPO در سلول‌ها تحت اثر تیمارها به ویژه US، به علت آسیب سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاهای درون سلولی است.

فعالیت PO نیز همانند دو آنزیم دیگر، تحت اثر US نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. آنزیم PO نیز همانند PPO در اکسیداسیون ترکیبات فنلی و تبدیل فرآورده‌های اکسید شده به رنگیزه‌های قهوه‌ای یا سیاه ملانین دخالت دارد (Lee, 2000). افزایش فعالیت PO نیز نشان می‌دهد که پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی

### منابع

- Baldi, A., Jain, A. and Bisaria V. C. (2008) Co-culture of arbuscular mycorrhiza-like fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) with plant cells of *Linum album* for enhanced production of podophyllotoxin: a first report. *Biotechnology Letter* 30: 1671-1677.
- Banu, M. N. A., Hoque, A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and

- Murata, Y. (2009) Proline and glycine betaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166: 146-156.
- Bradford, M. A. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157-2184.
- De Vos, C. H. R., Schat, H., De Waal, M. A. D., Vooijs, R. and Ernst, W. H. O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiologiae Plantarum* 82: 523-528.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654-660.
- Dornenburg, H. and Knorr, D. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 674-684.
- Dornenburg, H. and Knorr, D. (1997) Evaluation of elicitor and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4173-4177.
- Edmonds, P. D. and Ross, P. (1988) Protein synthesis by neuroblastoma cells is enhanced by exposure to burst-mode ultrasound cavitation. *Ultrasound in Medicine and Biology* 14: 219-223.
- Esmailzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Behmanesh, M., Safaie, N., Murata, J., Araki, R., Yamagaki, T. and Satake, H. (2012) Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of Plant Physiology* 169: 487-491.
- Frizzell, L. A. (1988) Biological effects of acoustic cavitation. In: *Ultrasound, its chemical, physical and biological effects* (Ed. Suslick, K. S.) 287-303. VCH Publishers, Inc., Weinheim.
- Furden, B. V., Humburg, A. and Fuss, E. (2005) Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. *Plant Cell Report* 24: 312-317.
- Gordon, A. G. (1971) Beneficial effects of ultrasound on plants, a review. *Ultrasonics* 9: 88-94.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1990) Protein synthesis stimulated in sugar beet cells and protoplasts. *Ultrasound in Medicine and Biology* 16: 719-724.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1992) Sonication: a new method for gene transfer to plants. *Physiologiae Plantarum* 85: 230-234.
- Koch, J. R., Scherzer, A. J., Eshita, S. M. and Davis, K. R. (1998) Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with the lack of defense gene activation. *Plant Physiology* 118: 1243-1252.
- Komaraiah, P., Kishor, P. B. K., Carlsson, M., Magnusson, K. E. and Mandenius, C. F. (2005) Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science* 168: 1337-1344.
- Lawton, M. A. and Lamb, C. J. (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular and Cellular Biology* 7(1): 335-341.
- Lee, C. Y. (2000) Enzymatic browning reaction. In: *Encyclopedia of food science and technology* (Ed. Francis, F. J.) 208-218. John Wiley & Sons Inc., New York.

- Lin, L. D. and Wu, J. Y. (2002) Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. *Biotechnology and Bioengineering* 78: 81-88.
- Liu, Y. Y., Yoshikoshi, A., Wang, B. C. and Sakanishi, A. (2003) Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27: 287-293.
- Martinez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77: 147-161.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ochoa-Alejo, N. and Gomez-Peralta, J. E. (1993) Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Physiology* 141: 147-152.
- Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh, M. (2011) Ultrasound potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. *Ultrasound in Medicine and Biology* 37: 1938-1947.
- Safari, M., Ghanati, F., Hajnorouzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. and Mokhtari-Dizaji, M. (2012) Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. *Biotechnology Letters* 34: 1137-1141.
- Sales, J. M. and Resurreccion, A. V. A. (2010) Phenolic profile, antioxidants and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. *Food Chemistry* 122: 795-803.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated been plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. X. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
- Wood, B. E., Aldrich, H. C. and Ingram, L. O. (1997) Ultrasound stimulation of ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnology Progress* 13: 232-237.
- Wu, J. and Ge, X. (2004) Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 85: 714-721.
- Wu, J. and Lin, L. (2002) Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. *Biotechnology Progress* 18: 862-866.
- Wu, J. and Lin, L. (2003) Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and *in situ* solvent extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 151-155.

## بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های آویشن (*Thymus vulgaris*) تحت تنش شوری در شرایط کشت درون‌شیشه

رؤیا رضوی‌زاده \* و نسیم محققیان

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

### چکیده

شوری از عوامل مهم محدودکننده رشد گیاهان و تهدیدکننده پایداری کشاورزی در مناطق وسیعی از جهان است. به نظر می‌رسد ارزیابی گیاهان دارویی ارزشمند از نظر غذایی، دارویی و بهداشتی نظیر گیاه آویشن، تحت تنش شوری، به عنوان تلاش‌های تحقیقاتی با هدف کشف مزایای اقتصادی یا بهداشتی، ضروری است. مطالعه حاضر، به منظور بررسی اثر شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه در یک گونه آویشن (*Thymus vulgaris*) در شرایط کشت درون‌شیشه طراحی شد. گیاهچه‌های آویشن حاصل از کشت بذرها در آویشن، چهار هفته پس از رشد در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتیگراد و در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد، به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) منتقل شدند و ۲۵ روز پس از واکنش شاخص‌هایی نظیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مواد مؤثره دارویی در گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. ۲۵ روز پس از تیمار شوری، مقدار کلروفیل‌های a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و پروتئین محلول کل در گیاهچه‌ها با افزایش غلظت نمک کاهش معنی‌داری یافت، در حالی که افزایش کربوهیدرات‌ها، پروتئین و فنل‌ها را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین، تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. نتایج GC-MS نشان داد تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهچه‌های آویشن تحت تأثیر شوری دچار تغییرات عمده‌ای گردید. با افزایش شوری میزان پی-سیمن و گاما-تریپتین افزایش و میزان تیمول کاهش یافت. به طور کلی، مشاهده شد که تنش شوری با تغییر در شاخص‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و میزان تولید مواد مؤثره گیاه آویشن می‌تواند سبب تغییر در ارزش و خواص دارویی آن گردد.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آویشن، کشت درون‌شیشه‌ای، تنش شوری، متابولیت‌های ثانویه

## مقدمه

انتقال بسیاری از بیماری‌ها از طریق غذا، محصولات آرایشی و بهداشتی است، لزوم اطمینان از ایمنی و سلامت این مواد از یک سو و ترجیح مردم به استفاده از محصولات طبیعی یا برخاسته از طبیعت از سویی دیگر، سبب شده است تا افزایش تقاضا در استفاده از منابع طبیعی در صنایع مختلف غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و غیره به جای فرآورده‌های سنتتیک و مصنوعی در صنعت نگهداری غذا یا مصارف دارویی، پزشکی، آرایشی و بهداشتی از اهمیت بسیاری برخوردار گردد. این موضوع، اهمیت مطالعه در مورد نگهدارنده‌های طبیعی، که منبع عمده آنها متابولیت‌های ثانویه یا مواد مؤثره به دست آمده از گیاهان دارویی است و تغییر در میزان تولید این مواد تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی را بیشتر نشان می‌دهد. در نتیجه، امروزه پژوهش‌ها برای یافتن جانشینی برای داروهای فعلی نظیر انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌سرطان‌ها و بررسی داروهای سنتی مانند گیاهان دارویی شدت یافته است و به عبارتی، گیاهان دارویی از اقبال عمومی به‌رمنند شده‌اند. بسیاری از گونه‌های گیاهان منبع بزرگی از مواد فعال زیستی در کره زمین هستند به طوری که پیش از معرفی داروهای شیمیایی، انسان برای حفظ سلامتی خود، از گیاهان شف‌بخش استفاده می‌نمود. گیاه آویشن با نام علمی *Thymus vulgaris* یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی است که در کشورهای آسیایی و اروپایی مصارف متنوعی در طب سنتی، صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی دارد (Rustaiyan *et al.*, 2000). این گیاه با دارا بودن متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری نظیر مونوترپن‌های فنلی از جمله:

تیمول و کارواکرول که ایزومر تیمول است، پیش‌سازهای هیدروکربنی مونوترپنی مانند پی-سیمین و گاما-ترپنین، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار مانند لینالول و بورنئول، کامفن و ... دارای خواص غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی فراوانی است که می‌توان خواص: ضد سرطان، ضد اسپاسم، ضد نفخ، معرق، ضد عفونی‌کننده، خلط‌آور، آرام‌بخش بودن، خوشبوکننده، طعم‌دهنده و دافع حشرات را نام برد (Soto-Mendivil Nakamura *et al.*, 2006؛ Wong *et al.*, 2006؛ Zarrini *et al.*, 2010). تنش‌های محیطی زیادی نظیر: تغییرات گسترده آب و هوایی کره زمین، بروز خشکسالی و تشدید تنش شوری، بر بهره‌وری محصولات زراعی و سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارند و ارزش دارویی گیاهان دارویی تولیدکننده آنها را تغییر می‌دهند (Sudha and Ravishankar, 2003). گزارش‌های متعدد تأییدکننده بر تأثیر تنش‌های محیطی، مواد معدنی مانند کلسیم و نیتریک اکسید یا فیتوهورمون‌هایی مانند آبسزیک اسید (ABA)، سالیسیلیک اسید (SA)، پلی‌آمین‌ها (polyamines) و جاسمونیک اسید (JA) بر سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان موجود است (Bennett Ravishankar and Rao, and Wallsgrave, 1994؛ Esmailzadeh Tuteja and Sopory, 2008؛ 2000؛ Bahabadi and Sharifi, 2013). با توجه به تأثیرپذیری گیاهان از عوامل محیطی، شرایط و میزان سنتز و تجمع ترکیبات ثانویه ممکن است در طول زندگی گیاه دست‌خوش تغییر گردد. شوری و حضور غلظت بالای از کلرید سدیم و نمک‌های دیگر، به عنوان یکی از تنش‌های مخرب محیطی باعث بروز

و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به شوری می‌تواند متفاوت باشد (Abraham *et al.*, 2011). بنابراین، لازم است بهبود تحمل به شوری در گیاهان با توسعه روش‌های جدید مانند کشت بافت گیاهی مورد بررسی قرار گیرد.

کشت بافت گیاهی، شرایط کنترل شده و مستقل از تغییرات محیطی و عوامل طبیعی را برای رشد سریع تر گیاه و تولید و بازدهی بیشتر در سطح کمتر، در سیستم در شیشه و در تمامی طول سال مهیا می‌سازد که این مزیت برای کشت بسیاری از گیاهان که در طبیعت تنها در فصول خاصی وجود دارند دارای اهمیت بسیاری است. از سوی دیگر، روش کشت بافت تاکنون در بررسی مسیرهای بیوسنتزی، بیوشیمیایی و آنزیمی، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات مؤثر دارویی و مهم گیاهان، اثر عوامل مختلف همچون تنش‌های زیستی و غیرزیستی کاربرد زیادی داشته است. کشت‌های درون‌شیشه‌ای برای ارزیابی مقاومت به شوری در بسیاری از گونه‌های دارویی مفید است که در نهایت به انتخاب صفات مطلوب در سلول و باززایی به گیاهان برتر منجر می‌شود (Rai *et al.*, 2011).

آویشن یک گیاه آروماتیک است که به دلیل داشتن روغن‌های ضروری مانند تیمول و سایر مواد مؤثره دارای خواص دارویی فراوانی است و در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز کاربرد فراوانی دارد. با توجه به گستره وسیع تأثیرگذاری تنش شوری در خاک‌های کشور، مطالعه حاضر از یک سو با هدف بررسی میزان تحمل به شوری گیاه آویشن در شرایط کشت در شیشه و همچنین بررسی اثر تنش شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در

طیف گسترده‌ای از آشفته‌گی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مانند کم‌آبی سلولی و حذف آب از سیتوپلاسم و در نتیجه کاهش حجم می‌شود که تنش اسمزی و سمیت یونی را به دنبال دارد و بر اساس مطالعات صورت گرفته، تغییر در میزان متابولیت‌های ثانویه خاص مانند پلی‌آمین‌ها و فنل‌ها و یا بسیاری دیگر از مواد (Mutlu and Navarro *et al.*, 2006؛ Bozcuk, 2007) را به دنبال داشته است. همچنین شوری با کاهش انتقال الکترون، به تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر می‌شود که می‌تواند باعث آسیب‌های اکسیداتیو قابل توجهی به رنگیزه‌های گیاهی از جمله کلروفیل و درشت مولکول‌هایی مانند نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و غشای لیپیدی گردد (Ashraf, 2009).

گیاهان از سازوکارهای مختلف فیزیولوژی و بیوشیمیایی برای بقای خود در خاک‌های شور استفاده می‌کنند که از آنها می‌توان به تعادل و انتقال یون‌ها، جذب یون‌ها، سنتز املاح محلول و اسمولیت‌ها نظیر کربوهیدرات‌های محلول (Munns and Tester, 2008)، فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) (James *et al.*, 2011) و سنتز پلی‌آمین‌ها نظیر پرولین (Rahnama *et al.*, 2010) اشاره کرد. از آنجا که شدت آسیب‌های وارد شده به گیاهان در اثر شوری و تنش اکسیداتیو به عنوان تنش ثانویه و همراه با شوری، در میان گونه‌های مختلف گیاهی، اندام‌های گیاهی یا در مراحل مختلف رشد متفاوت است، عملکرد گونه‌های مختلف گیاهی در میزان سنتز و تجمع این ترکیبات آلی و تغییر در ظرفیت

در ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد همگن و سانتریفیوژ شد. سپس، ۱۰ میلی لیتر استون اضافه شد تا محلول به حجم ۱۵ میلی لیتر برسد و با انتقال ۳ میلی لیتر از عصاره نمونه‌ها به کووت، جذب خوانی در میلی گرم بافت مورد نظر در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر انجام شد و در نهایت، مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی بر حسب گرم وزن تر محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987).

### سنجش پرولین، پروتئین، فنل و قندهای

**محلول:** برای سنجش پرولین، نمونه‌های تر وزن شده در ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد همگن و سانتریفیوژ شد. ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین (۱۲۵ میلی گرم نین هیدرین، ۲۰ میلی لیتر فسفریک اسید ۶ مولار و ۳۰ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال) به نمونه‌ها افزوده شده، به مدت یک ساعت در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. با افزودن تولوئن به نمونه‌ها و جداسازی محلول رویی، شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Bates et al., 1973).

برای اندازه‌گیری فنل، ۰/۱ گرم نمونه‌های تر توزین و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد جوشانده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۵ میلی لیتر محلول فوقانی جدا شد. به ۲/۵ میلی لیتر از این محلول ۲/۵ میلی لیتر فولن رقیق شده با آب (۳:۱) و ۵ میلی لیتر کربنات سدیم اشباع، افزوده شده، به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی نگه داشته شد. پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰

گیاهچه‌های آویشن انجام شده است و از سوی دیگر، سطح تغییرات متابولیت‌های ثانویه در گیاهچه‌های آویشن و تغییر ارزش دارویی این گیاه در پاسخ به حضور نمک، با استفاده از روش GC-MS، در شرایط کشت درون‌شیشه بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

#### کشت گیاه در شرایط درون‌شیشه: بذرهای

آویشن پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط کشت پایه (Murashige and Skoog, MS (1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۷ گرم در لیتر آگار با اسیدیته معادل ۵/۸ به منظور جوانه‌زنی قرار گرفتند. سپس محیط‌های کشت حاوی بذرها در اتاقک رشد در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند تا بذرها جوانه زده و رشد کنند. ۴ هفته پس از کشت، گیاهچه‌ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی مولار) منتقل شدند. ۲۵ روز پس از واکشت گیاهچه‌ها در محیط‌های تحت تیمار شوری، شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی متعددی از قبیل: میزان پرولین، کلروفیل، کاروتنوئید، فنل و قندهای محلول، مقدار پروتئین، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی در گیاهچه‌های آویشن اندازه‌گیری شدند.

#### سنجش کلروفیل و کاروتنوئید: به منظور سنجش

کلروفیل و کاروتنوئید، ۰/۰۵ گرم از نمونه‌های برگی



### فعالیت سنجی آنزیم‌های آسکوربات

پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز: مقدار ۰/۱ گرم از بخش هوایی توزین و درون هاون روی یخ قرار داده شد و ۱/۵ میلی لیتر از بافر نمک‌های فسفات حاوی PVP با اسیدیته برابر ۷/۴ به آن افزوده شد. بافت مورد نظر در هاون ساییده شد. بافت‌های عصاره‌گیری شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند.

در سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز، محلول واکنش شامل ۶۲۵ میکرولیتر بافر فسفات حاوی EDTA، ۱۷۵ میکرولیتر آسکوربیک اسید، ۵۰ میکرولیتر  $H_2O_2$ ، ۵۰ میکرولیتر BSA و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش مقدار فعالیت آنزیمی یک دقیقه پس از افزودن عصاره آنزیمی به محیط واکنش انجام شد و کاهش جذب طی ۲ دقیقه از واکنش در ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز با استفاده از ضریب جذب مولی آسکوربیک اسید (۲/۸ بر میلی مولار بر سانتی متر) محاسبه شد (Nakano and Asada, 1981).

بررسی میزان فعالیت کاتالاز با بررسی کاهش مقدار  $H_2O_2$  در ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش شامل: بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (اسیدیته=۷)، ۱۵ میلی مولار  $H_2O_2$  و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در یک حجم ۳ میلی لیتر بود. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی مولی ۰/۰۳۹ بر میلی مولار بر سانتی متر محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) به ازای میلی گرم پروتئین بیان شد (Aebi, 1984).

سانتریفیوژ شد. میزان جذب محلول نمونه‌ها در طول موج ۶۴۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. رسم منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول در غلظت‌های مختلف ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی لیتر و غلظت فنل بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه شد (Matta and Giai, 1969).

برای سنجش مقدار قندهای محلول پس از تهیه معرف آنترون با حل کردن ۰/۵ گرم آنترون در ۵۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ۹۵ درصد، ۰/۵ گرم از نمونه‌ها در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه همگن و سانتریفیوژ شد. سپس به ۴ میلی لیتر از محلول رویی ۸ میلی لیتر معرف آنترون اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد و جذب نوری آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل U-100، شرکت Shimadzu، ساخت ژاپن) خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز رسم شد و تعیین میزان قند بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید (Yemm and Willis, 1954).

برای سنجش پروتئین‌ها، ۰/۱ گرم بافت برگ در ۴ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیته=۷/۲) به همراه ۰/۱ گرم پلی وینیل پلی پیرولیدین (PVP) در هاون ساییده و سانتریفیوژ گردید. جهت اندازه‌گیری پروتئین‌ها با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) از محلول رویی استفاده شد. جذب عصاره‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد پروتئین‌ها با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) رسم انجام شد. میزان پروتئین محلول کل بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس بازدارندگی آنزیم SOD از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) اندازه‌گیری شد. در این روش، مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته = ۱۰/۲)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۶۳ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱/۳ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که با آب مقطر به حجم ۳ میلی‌لیتر رسید. واکنش با برداشتن فویل آلومینیومی و قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور (5000 LUX) آغاز گردید. پس از ۱۵ دقیقه نور قطع شده و بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT در ۵۶۰ نانومتر می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Giannopolitis and Ries, 1977).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس بازدارندگی آنزیم SOD از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) اندازه‌گیری شد. در این روش، مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته = ۱۰/۲)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۶۳ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱/۳ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که با آب مقطر به حجم ۳ میلی‌لیتر رسید. واکنش با برداشتن فویل آلومینیومی و قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور (5000 LUX) آغاز گردید. پس از ۱۵ دقیقه نور قطع شده و بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT در ۵۶۰ نانومتر می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Giannopolitis and Ries, 1977).

## نتایج

### اثر تنش شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیک و

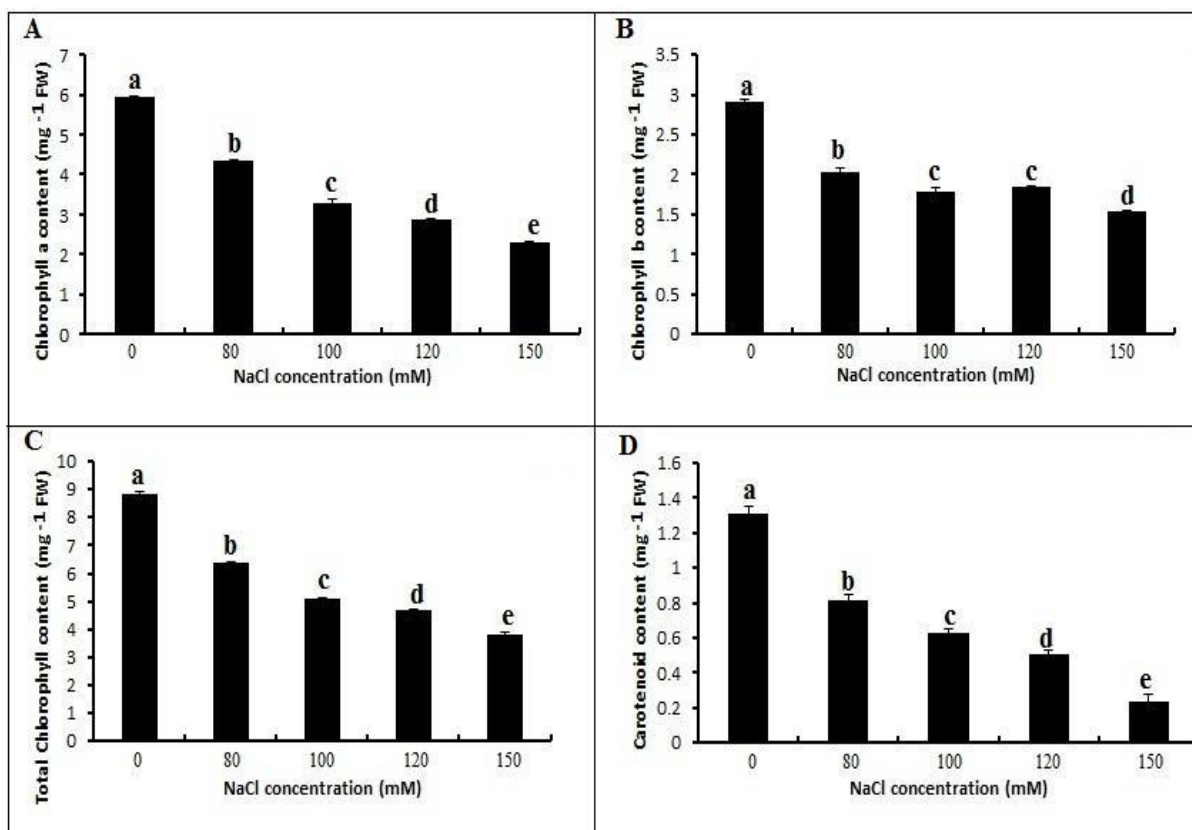
#### بیوشیمیایی گیاهچه‌های آویشن

تأثیر تنش شوری بر سنتز کلروفیل و کاروتنوئید: تغییرات مشاهده شده در میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاهچه‌های آویشن تحت تأثیر تنش شوری در شکل نشان ۱ داده شده است. افزایش غلظت نمک در محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل‌های a و b در گیاهچه‌های آویشن در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱-A و B). در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار نمک طی ۲۵ روز سطح کلروفیل در گیاهچه‌های آویشن به کمترین میزان رسید. میزان کلروفیل کل در گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نمک نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد و در تیمار

اندازه‌گیری مواد مؤثره اسانس با دستگاه گاز کروماتوگراف جرم‌سنجی: بدین منظور، از دستگاه گاز کروماتوگراف (مدل HP-5890، شرکت Hewlett-Packard، ساخت آمریکا) دارای سیستم تله یونی استفاده شد که در آن انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتیگراد برای تولید منبع یون تنظیم گردید. رقیق کردن نمونه‌ها با روش شکافت با نسبت ۱:۱۰۰ انجام شد. ستون موئینه به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۰ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۲۵ میکرومتر و ذرات از جنس متیل سیلیکون کراس لینک بود. شناساگر از نوع انتخابگر جرمی (دستگاه MS، مدل HP-5890، شرکت Hewlett-

کاهش میزان کاروتنوئید در مقایسه با شاهد و نیز در مقایسه با سایر غلظت‌های نمک گردید (شکل ۱-D).

۱۵۰ میلی‌مولار نمک به کمترین مقدار رسید (شکل ۱-C). همچنین، افزایش غلظت نمک در محیط کشت باعث



شکل ۱- تأثیر تنش شوری بر غلظت کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) در گیاهچه‌های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است.

۱۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، باعث افزایش معنی‌دار میزان قندهای محلول در گیاهچه‌های آویشن نسبت به گیاهان شاهد و نیز در مقایسه سطوح مختلف تیمار با یکدیگر گردید و به طور کلی، با تشدید تنش شوری، سنتز قندهای محلول افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲-B).

شکل ۲-C نشان‌دهنده تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر سنتز فنل‌ها در گیاهچه‌های آویشن است. مشاهده شد که ۲۵ روز پس از کشت با افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار، سنتز فنل‌ها در

### اثر تنش شوری بر سنتز پرولین، فنل، قندهای

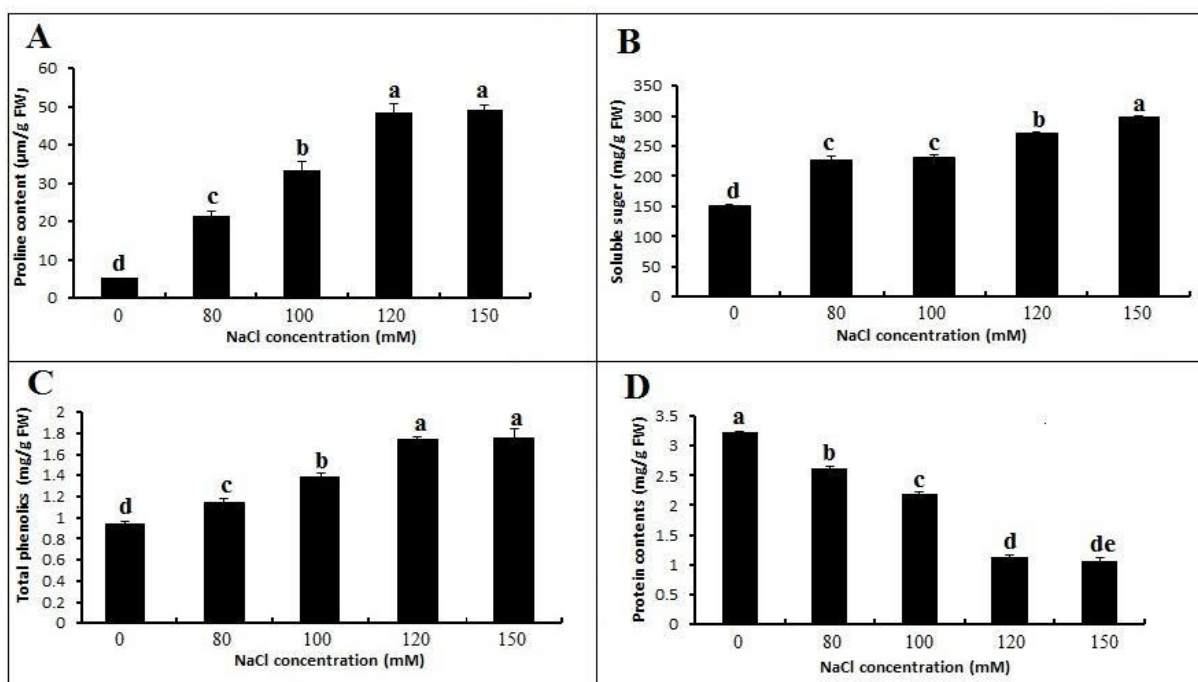
محلول و پروتئین: افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، میزان پرولین را در گیاهچه‌های آویشن به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۲-A)، به طوری که بیشترین میزان تولید و تجمع این اسمولیت، ۲۵ روز پس از کشت در غلظت‌های ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک و کمترین مقدار در گیاهان شاهد مشاهده گردید.

نتایج اندازه‌گیری قندهای محلول نشان داد که طی ۲۵ روز پس از کشت، افزایش غلظت نمک تا سطح

کشت شده در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف نمک در مقایسه با گیاهان شاهد و نیز در مقایسه سطوح مختلف تیماری با یکدیگر است. ۲۵ روز پس از کشت بیشترین میزان پروتئین در گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS بدون نمک دیده شد. به طور کلی، افزایش غلظت نمک به کاهش میزان پروتئین منجر گردید.

گیاهچه‌های آویشن نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافته است. به طور کلی، با تشدید تنش شوری، سنتز فنل‌ها افزایش معنی‌دار داشت و گیاهچه‌های آویشن در ۱۵۰ میلی‌مولار نمک از تمام ظرفیت خود در سنتز فنل‌ها استفاده کرده‌اند.

شکل ۲-D نشان‌دهنده وجود تفاوت آماری معنی‌دار در محتوای پروتئین در گیاهچه‌های آویشن



شکل ۲- تأثیر تنش شوری بر غلظت پرولین (A)، قندهای محلول (B)، فنل (C) و پروتئین (D) در گیاهچه‌های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است.

اما با افزایش غلظت نمک تا ۱۵۰ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به سطح ۱۲۰ میلی‌مولار کاهش نشان داد.

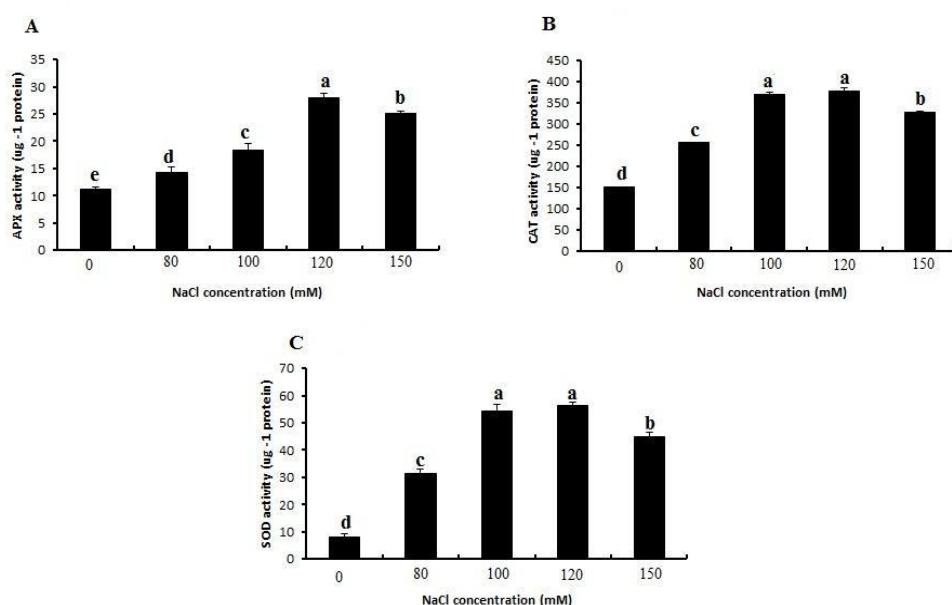
شکل ۳-B نشان می‌دهد که فعالیت کاتالاز در گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف نمک نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌دار داشته، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۰

### فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و

سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری: همان طور که در شکل ۳-A نشان داده شده است، طی ۲۵ روز پس از کشت، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های آویشن با افزایش غلظت نمک تا ۱۲۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد و سایر غلظت‌های نمک داشت،

افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۲۰ میلی‌مولار در محیط کشت MS، طی ۲۵ روز پس از کشت، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد و در مقایسه با سایر غلظت‌های نمک داشت. اما افزایش بیشتر غلظت نمک به کاهش فعالیت این آنزیم منجر شد. بیشترین سطح فعالیت SOD در ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک، مشاهده گردید.

میلی‌مولار بیشترین فعالیت را نشان داده است، اما با افزایش میزان تنش در ۱۵۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به غلظت ۱۲۰ مشاهده شد. در شکل ۳-C مشخص است که سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در گیاهچه‌های آویشن، با



شکل ۳- تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (A)، کاتالاز (B) و سوپراکسید دیسموتاز (C) در گیاهچه‌های آویشن. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است.

همانگی را نشان دادند. در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نمک، میزان آلفا-تریپنولن، آلفا-پینن، آلفا-فیلندرن، میرسن و ۲،۶-دی متیل ۵-۵ هپتانال کاهش یافت که این کاهش در سطح مونوترپن فنلی مانند: تیمول، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار (لینالول و بورنئول)، کامفن قابل توجه بود. در حالی که با اعمال تنش شوری سطح مونوترپن‌های مونوکرینی (پی-سیمن و گاما-تریپنین)، ۱،۷-اکتا دی ان، پارامتن، ترانس-اوسیمین، متا-۳،۸-دی انر، ترانس-دی هیدرو کارون، کالامن، گاما-

**اثر تنش شوری بر مواد مؤثره اسانس گیاه آویشن:** تغییرات ترکیبات اسانس گیاهچه‌های آویشن کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۱۲۰ میلی‌مولار نمک در مقایسه با گیاهان شاهد، طی ۲۵ روز پس از واکشت، با استفاده از GC-MS آنالیز شد (جدول ۱). به طور کلی، در گیاهان شاهد سطح مونوترپن فنلی (تیمول) به مراتب بیشتر از پیش سازهای هیدروکربن مونوترپینی (HC) شامل پی-سیمن و گاما-تریپنین است که در پاسخ به حضور نمک در محیط کشت MS، تنوع الگویی

۲،۴-دی متیل ۲،۴-هپتادین منجر شد. می توان گفت که غلظت بالای نمک در محیط کشت آویشن به افزایش سطح پیش سازهای مونوترپن های هیدروکربنی (پی-سیمن و گاما-ترپینن) منجر شده در حالی که سطح تیمول را کاهش داده است.

کادینن، کارواکرول و کارواکرول استات، ترپن ها (به طور عمده بتا-کاریوفیلن)، مشتقات اکسیژن آن (برای نمونه: کاریوفیلن اکسید) در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. شوری در سطح ۱۲۰ میلی مولار تولید ساینن را به صفر رساند، در حالی که به تولید ماده مؤثره

جدول ۱- محتوای نسبی مواد مؤثره اسانس گیاهچه های آویشن در غلظت های ۰ و ۱۲۰ میلی مولار نمک در شرایط کشت در شیشه

نام ماده	زمان بازداری (دقیقه)	محتوای نسبی (درصد)	
		۰ میلی مولار NaCl	۱۲۰ میلی مولار NaCl
1,3-Octadiene	۷:۱	۱/۲	۰/۹
1,7-Octadiene	۸:۲	۱/۵	۲/۴
2,4- dimethyl-2,4-heptadiene	۸:۸	-	۱/۸
$\alpha$ -Pinene	۹:۹	۳/۶	۱/۴
Camphene	۱۰:۵	۱/۵	۰/۹
Sabinene	۱۱:۸	۱/۸	-
Para-Menthene-3	۱۳:۱	۱/۴	۳/۶
Myrcene	۱۴:۳	۲/۶	۱/۴
$\alpha$ -Phellandrene	۱۵:۳	۱/۸	۱/۵
2,6-Dimethyl-5-5heptanal	۱۵:۹	۲/۰	۱/۲
$\alpha$ -Terpinene	۱۶:۸	۰/۹	۰/۹
P-Cymene	۱۷:۶	۱۹/۲	۲۱/۹
Gama- Terpinene	۱۸:۹	۱۵/۴	۲۲/۴
Trans-Ocimene	۱۹:۵	۱/۴	۲/۱
Linalool	۲۱:۴	۲/۳	۰/۹
Mentha-3,8-diener	۲۲:۱	۱/۵	۱/۸
$\alpha$ -Terpinolene	۲۵:۲	۲/۵	۱/۴
Para-Cimene	۲۶:۷	۲/۱	۲/۱
Borneol	۲۹:۸	۱/۸	۱/۵
Trance-Dihydrocarvone	۳۳:۵	۰/۹	۱/۶
Thymol methyl ether	۳۴:۷	۱/۱	۲/۰
3,6-Dimethyl-5-5heptanal	۳۵:۸	۱/۳	۱/۴
Thymol	۳۶:۶	۲۶/۱	۱۸/۰
Caevacrol	۳۹:۲	۱/۳	۱/۵
Caevacrol acetate	۴۰:۱	۰/۹	۱/۱
$\beta$ -caryophyllene	۴۲:۲	۱/۱	۱/۴
Calamenene	۴۳:۵	۰/۸	۱/۰
$\gamma$ -Cadinene	۴۵:۱	۱/۶	۱/۲

## بحث

از آنجا که تنش شوری اثر بسیار گسترده‌ای در گیاهان دارد، نحوه پاسخ دهی گیاه آویشن، به عنوان یک گیاه ارزشمند از نظر دارویی و بهداشتی، نسبت به تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان عالی، غلظت و میزان پرولین خود را در پاسخ به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌دهند و تولید زیاد پرولین یک پاسخ وسیع مشاهده شده در گیاهان در مواجهه با انواع تنش‌های محیطی است. در واقع، این اعتقاد وجود دارد که پرولین در ایجاد تحمل به تنش‌ها نقش دارد (Trovato *et al.*, 2008؛ Verbruggen and Hermans, 2008؛ Mattioli *et al.*, 2009). تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین در شرایط تنش شوری در گیاهان متعددی از جمله: نخود (Waheed *et al.*, 2006) و ذرت (Cham and Kirdmanee, 2009) اثبات شده است که می‌تواند به عنوان یک معیار انتخاب برای ارزیابی مقاوم‌ترین گونه‌ها در نظر گرفته شود (Ahmad *et al.*, 2009). در پژوهش حاضر، با افزایش غلظت نمک در گیاهچه‌های آویشن، سنتز پرولین به طور معنی‌داری افزایش یافت و در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار به حداکثر رسید. این افزایش ممکن است در اثر افزایش بیان ژن *P5Cs* در پاسخ به شوری باشد به نحوی که افزایش سطح بیان ژن *P5Cs* در *Opuntia streptacantha* (Silva-Ortega *et al.*, 2008) به موازات افزایش پرولین در پاسخ به شوری نیز گزارش شده است. کلروفیل نقش بسیار مهمی در فرآیندهای رشدی گیاهان دارد (Eckhardt *et al.*, 2004). بیوسنتز و

تخریب کلروفیل تحت کنترل مسیرهای پیچیده سلولی و مولکولی است و این مسیرها توسط عوامل مختلفی تنظیم می‌شوند. فتوسنتز، به عنوان یک مسیر متابولیک مهم در گیاهان عالی و رنگیزه‌های مرتبط با آن یکی از اهداف اصلی مورد تهدید طی تنش شوری محسوب می‌گردد (Eckhardt *et al.*, 2004). محتوای کلروفیل در گیاهچه‌های آویشن با افزایش غلظت نمک کاهش معنی‌دار یافت و در غلظت بالاتر از ۱۲۰ میلی‌مولار برگ‌ها دچار نکروز شدند. احتمالاً سمیت ناشی از کلر در سنتز کلروفیل اختلال ایجاد کرده است. اگر چه هر دو یون سدیم و کلر در بسیاری از اختلالات فیزیولوژیک گیاهان نقش دارند اما سمیت کلر بیشتر از سدیم است (Tavakkoli *et al.*, 2010). گزارش شده است که محتوای کلروفیل در گونه‌های مختلف گیاهی تحت تنش شوری متفاوت است (Bayuelo-Jimenez *et al.*, 2012؛ Jamil and Rha, 2013) و در شرایط تنش کاهش می‌یابد که در بسیاری از گیاهان مانند *Stevia rebaudiana* (Rathore *et al.*, 2014) و خیار (Zhang *et al.*, 2009) گزارش شده است. کاهش کلروفیل و فتوسنتز در واکنش گیاهان به تنش شوری اثبات شده است (Jamil and Rha, 2013). کاهش کلروفیل، ظرفیت فتوسنتزی (واکنش هیل و تثبیت نوری CO<sub>2</sub>)، رنگیزه‌های کاروتنوئیدی و فعالیت آنزیم روبیسکو در گیاهچه‌های ذرت نیز تحت تنش شوری مشاهده شده است (Khodary, 2004).

تنش‌های اکسیداتیو مانند شوری عامل اصلی تولید ROS و دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند که به عدم تعادل و بروز چالش‌های فیزیولوژیکی در گیاهان منجر

شده است که مطابق با نتایج پژوهش حاضر است. آمینو اسیدهایی مانند سیستین، آرژنین و متیونین، حدود ۵۵ درصد از کل آمینو اسیدهای آزاد را تشکیل می‌دهند و در زمان مواجهه با تنش شوری کاهش می‌یابند، در حالی که غلظت پرولین در پاسخ به تنش شوری افزایش می‌یابد (Fidalgo et al., 2004). فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان یکی از سازوکارهای دفاعی برای مهار سنتز ROS در پاسخ به تنش‌های مختلف زیست محیطی از جمله شوری است (Ashraf and Harris, 2004). گزارش‌های متعددی نیز در ارتباط با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای مهار ROS و افزایش مقاومت به شوری در گیاهان مانند برنج و ذرت ثبت شده است (Sancho et al., 1996؛ Gill et al., 2013؛ Saxena et al., 2013) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

اگرچه بیوستتز متابولیت‌های ثانویه از مسیرهای ژنتیکی تنظیم می‌شود اما بیوستتز و عملکرد آنها متأثر از عوامل محیطی نیز هست (Yaniv and Paleitch, 1982؛ Charles et al., 1994). بررسی‌های متعدد مشخص کرده است که تغییر در عملکرد اسانس و ترکیبات آنها ناشی از فعالیت آنزیم‌ها و بهبود متابولیسم آنهاست (Hendawy and Khalid, 2005). در مطالعات پیشین از تنش‌های محیطی (درجه حرارت بالا و پایین، خشکسالی، شوری، اشعه فرابنفش و آلودگی پاتوژن‌ها) و محرک‌های مختلف برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است (Dixon and Paiva, 1995). مشخص شده است که تنش‌ها و محرک‌ها اثر قابل توجهی در تغییرات سطح فنل‌ها در کشت بافت داشته‌اند

می‌شوند (Foyer and Noctor, 2003). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عبارت از فنل‌ها، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها هستند که در میان این ترکیبات، پلی‌فنل‌ها به ویژه فلاونوئیدها نقش مهمی در مهار ROS در گیاهان تحت تنش شوری دارند (Navarro et al., 2006). افزایش فنل‌ها تحت تنش شوری در بسیاری از گیاهان مانند *Lactuca sativas* (Lee et al., 2014) گزارش شده است. در پژوهش حاضر، افزایش غلظت نمک در محیط کشت نیز سطح فنل‌ها را در گیاهچه‌های آویشن افزایش داد.

گزارش‌های متعددی در مورد اثر شوری بر تجمع قندهای محلول به عنوان پاسخ به تنش شوری یا خشکی در گیاهان مختلف وجود دارد (Murakeozy et al., 2003)، این ترکیبات با حفاظت اسمزی (osmoprotection)، ذخیره‌سازی کربن و مهار ROS در کاهش تأثیرات تنش نقش دارند که نقش یک اسمولیت را در تثبیت سلولی غشا و حفظ تورژسانس بازی می‌کند (Jouve et al., 2004). در شرایط تنش، در گیاهچه‌های آویشن تحت تنش شوری، میزان قندهای محلول افزایش معنی‌داری نشان داد. قندها نقش مهمی در سازش ریشه‌ها از طریق تولید پیش‌سازهای لازم برای آنزیم‌های سنتتازی، تولید انرژی متابولیک و تنظیم اسمزی ریشه‌ها دارند (Barakat, 2011). انباشته شدن قندها می‌تواند به علت فعال شدن آنزیم‌های بیوستتزی کربوهیدرات‌ها باشد که این انباشتگی نقش مهمی در کاهش آثار مخرب تنش شوری از طریق تنظیم اسمزی دارد (Ackerson, 1985).

تأثیر منفی تنش شوری بر سنتز پروتئین در شرایط در شیشه در گیاهانی مانند چاودار و سیب‌زمینی تأیید



واسط برای تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت داده شود (Morales *et al.*, 1993). از سوی دیگر، کاهش آنابولیسیم گیاهان تحت تنش شوری می‌تواند کاهش سنتز متابولیت‌های اولیه و تجمع مواد مؤثره گیاهان را در پی داشته باشد (Morales *et al.*, 1993). در هر حال، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها و متابولیسیم گیاهی در اثر شوری، سطح متابولیت‌های ثانویه را در گیاهان دارویی دست‌خوش تغییر می‌نماید (Burbott and Loomis, 1969).

### جمع‌بندی

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که تنش شوری و تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار غلظت‌های نمک سبب القای پاسخ‌های فیزیولوژیک و افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های آویشن در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود که می‌تواند در سازگاری و مقابله گیاهان در برابر شرایط تنش اهمیت داشته باشد. همچنین، تنش شوری به اعمال تغییراتی در میزان تولید و تجمع مواد مؤثره اسانس آویشن منجر گردید. بنابراین، شاید بتوان با تنظیم و بهینه‌سازی شرایط محیطی در شرایط کشت درون‌شیشه در مقاطعی از رشد رویشی گیاه از اعمال تنش شوری به منظور افزایش برخی متابولیت‌ها و مواد مؤثره در آویشن بهره‌برداری نمود.

### سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه پیام نور و قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان برای همکاری با این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

(Chalker-Scott and Fenchigami, 1989). مقدار کل متابولیت‌های ثانویه نظیر: آلکالوئیدها، ماده مؤثره و ترکیبات فنلی در اندام‌های هوایی آویشن، نشان‌دهنده ارزش دارویی آن است. با توجه به نتایج جدول ۱ مشاهده شد که بیشترین حضور مواد مؤثره اسانس آویشن به مونوترپن‌های فنلی فعال (تیمول) و پیش‌سازهای هیدروکربنی مونوترپنی مانند پی-سیمین و گاما-ترپینن تعلق دارد. در پژوهش حاضر، تنش شوری به اعمال تغییراتی در میزان تولید و تجمع این ترکیبات منجر شد به طوری که شوری در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار سبب افزایش و کاهش برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های آویشن نسبت به شاهد گردید. با افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۲۰ میلی‌مولار میزان پی-سیمین و گاما-ترپینن نسبت به گیاه شاهد افزایش و از میزان تیمول کاسته شد. گزارش‌های متناقضی از تأثیر تنش شوری بر میزان روغن‌های ضروری در گیاهان دارویی موجود است. برای نمونه، تنش شوری به کاهش این ترکیبات در *Thymus maroccanus* (Belaqziz *et al.*, 2009)، *Trachyspermum ammi* (Ashraf and Orooj, 2006) و *Mentha piperita* (Tabatabaie and Nazari, 2007) منجر شده است. این در حالی است که افزایش متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری در *Satureja hortensis* (Baher *et al.*, 2002) نیز گزارش شده است. تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه و روغن‌های ضروری تحت تنش شوری یا افزایش مقدار این ترکیبات می‌تواند به علت افزایش تراکم غدد ترشح‌کننده این ترکیبات یا افزایش تعداد این غدد باشد (Charles *et al.*, 1990) یا به کاهش تولید متابولیت‌های اولیه در اثر شوری و در نتیجه در دسترس قرار گرفتن ترکیبات حد

## منبع

- Abraham, I., Salamo, P., Koncz, C. and Szabados, L. (2011) Identification of *Arabidopsis* and *Thellungiella* genes involved in salt tolerance by novel genetic system. *Acta Biologica Szegediensis* 55(1): 53-57.
- Ackerson, R. C. (1985) Osmoregulation of cotton in response to water stress III, effect of phosphorus fertility. *Journal of Plant Physiology* 77: 309-312.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Ahmad, P., Jeleel, C. A., Azooz, M. M. and Nabi, G. (2009) Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in Plants. *Botany Research International* 2: 11-20.
- Ashraf, M. (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27: 84-93.
- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Ashraf, M. and Orooj, A. (2006) Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). *Journal of Arid Environment* 64(2): 209-220.
- Baher, Z. F., Mirza, M., Ghorbanli, M. and Rezaii, M. B. (2002) The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L.. *Flavour and Fragrance Journal* 17: 275-277.
- Barakat, N. A. M. (2011) Oxidative stress markers and antioxidant potential of wheat treated with phytohormones under salinity stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 7(4): 250-267.
- Bates, L. S., Waldern, R. W. and Treare, L. D. (1973) Rapid determination of free proline for stress students. *Plant and soil* 39: 205-207.
- Bayuelo-Jimenez, J. S., Jasso-Plata, N. and Ochoa, I. (2012) Growth and physiological responses of *Phaseolus* species to salinity stress. *International Journal of Agronomy* 2012: 13-23.
- Belaqziz, R., Romane, A. and Abbad, A. (2009) Salt stress effects on germination, growth and essential oil content of an endemic thyme species in Morocco (*Thymus maroccanus* Ball.). *Journal of Applied Science and Research* 5(7): 858-863.
- Bennett, R. N. and Wallsgrove, R. M. (1994) Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytology* 127: 617-633.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burbott, A. J. and Loomis, W. D. (1969) Evidence for metabolic turnover of monoterpenes in peppermint. *Plant Physiology* 44: 173-179.
- Chalker-Scott, L. and Fnychigami, L. H. (1989) The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: *Low temperature stress physiology in crops* (ed. Paul, H. L.) 67-79. CRC Press, Boca Raton.
- Charles, D. J., Joly, R. J. and Simon, J. E. (1990) Effect of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. *Phytochemistry* 29: 2837-2840.
- 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.
- Chaum, S. and Kirdmanee, C. (2009) Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability

- and growth characters in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Botany* 41: 87-98.
- Davies, N. W. (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methylsilicon and carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography* 503: 1-24.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. (1995) Stressed induced phenyl propanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7): 1085-1097.
- Eckhardt, U., Grimm, B. and Hortensteiner, S. (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology* 56: 1-14.
- Esmailzadeh Bahabadi, S. and Sharifi M. (2013) Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. *Journal of Cell Tissue* 4(2): 119-128.
- Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I. and Salema, R. (2004) Effect of long term salt stress on antioxidant defense system, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annals of Applied Biology* 145: 185-192.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiolgia Plantarum* 119: 355-364.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Gill, S. S., Tajrishi, M., Madan, M. and Tuteja, N. (2013) A DESD-box helicase functions in salinity stress tolerance by improving photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. PB1). *Plant Molecular Biology* 82(1-2): 1-22.
- Hendawy, S. F. and Khalid, K. H. A. (2005) Response of sage (*Salvia officinalis* L.) plants to zinc application under different salinity levels. *Journal of Applied Science and Research* 1(2): 147-155.
- James, R. A., Blake, C., Byrt, C. S. and Munns, R. (2011) Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany* 62(8): 2939-2947.
- Jamil, M. and Rha, E. S. (2013) NaCl stress-induced reduction in growth, photosynthesis and protein in Mustard. *Journal of Agricultural Science* 5(9): 114-127.
- Jouve, L., Hoffmann, L. and Hausman, J. F. (2004) Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of Aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. *Plant Biology* 6: 74-80.
- Khodary, S. E. A. (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology* 6(1): 5-8.
- Lee, M. J., Son, J. E. and Oh, M. M. (2014) Growth and phenolic compounds of *Lactuca sativa* L. grown in a closed-type plant production system with UV-A, -B, or -C lamp. *Journal Science Food Agricultural* 94(2): 197-204.
- Li, X. M., Tian, S. L. and Pang, Z. C. (2009) Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and system distillation. *Food Chemistry* 115: 1114-1119.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Matta, A. G. and Giai, I. (1969) Accumulation of phenol in tomato plant infected by different forms of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 59: 512-513.
- Mattioli, R., Costantino, P. and Trovato, M. (2009) Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant*

- Signal Behavior 4(11): 1016-1018.
- Morales, C., Cusido, R. M., Palazon, J. and Bonfill, M. (1993) Response of *Digitalis purpurea* plants to temporary salinity. Journal of Plant Nutrition 16(2): 327-335.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59: 651-681.
- Murakeozy, E. P., Nagy, Z. and Duhaze, C. Bouchereau A. and Tuza, Z. (2003) Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. Plant Physiology 160(4): 395-401.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Mutlu, F. and Buzcuk, S. (2007) Salinity induced changes of free and bound polyamine levels in Sun flower (*Helianthus annuus* L.) roots differing in salt tolerance. Pakistan Journal of Botany 39: 1097-1102.
- Nakamura, A., Fujiwara, S., Matsumoto, I. and Abe, K. (2010) Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. Journal of Agriculture Food Chemistry 57(12): 5480-5485.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.
- Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C. and Martinez, V. (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. Food Chemistry 96: 66-73.
- Rahnama, A., James, R. A., Poustini, K. and Munns, R. (2010) Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. Functional Plant Biology 37(3): 255-263.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhawan, A. K. (2011) Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- an overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany 71: 89-98.
- Rathore, S., Singh, N. and Singh, S. K. (2014) Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated *in vitro*. Stress Physiology and Biochemistry 10: 287-296.
- Ravishankar, G. A. and Rao, S. R. (2000) Biotechnological production of phytopharmaceuticals. Plant Genetic Resources 4(1): 73-102.
- Rustaiyan, A., Masoudi, S., Monfared, H., Kamalinejad, A, Lajevardi, M., Sedaghat, T. and Yari, S. (2000) Volatile constituents of three *Thymus* species grown wild in Iran. Planta Medica 66(2): 197-198.
- Sancho, M. A., Milrad de Forchetii, S., Pliego, F., Valpuesta, V. and Quesada, M. A. (1996) Total peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 161-167.
- Saxena, S., Kaur, H. and Verma, P. (2013) Osmoprotectants: potential for crop improvement under adverse conditions. In: Plant acclimation to environmental stress (Eds. Tuteja, N. and Singh Gill, S.) 197-232. Springer, New York.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A. and Jiménez-Bremont, J. F. (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiology and Biochemistry 46(1): 82-92.

- Soto-Mendivil, E. A., Moreno-Rodriguez, J. F., Estarron-Espinosa, M., Garcia-Fajardo, J. A. and Obledo-Vazquez, E. N. (2006) Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. e-Gnosis 4: 16.
- Sudha, G. and Ravishankar, G. A. (2003) Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and involvement of calcium channel modulators. Current Science 84: 775-779.
- Tabatabaie, S. J. and Nazari, J. (2007) Influence of nutrient concentration and NaCl salinity on growth, photosynthesis and essential oil content of peppermint and *lemon verbena*. Turkish Journal of Agriculture 31: 245-253.
- Tavakkoli, E., Rengasamy, P. and McDonald, G. K. (2010) High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. Journal of Experimental Botany 61: 4449-4459.
- Trovato, M., Mattioli, R. and Costantino, P. (2008) Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. Rendiconti Lincei 19: 325-346.
- Tuteja, N. and Sopory, S. K. (2008) Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. Plant Signal Behavior 3(8): 525-536.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids 35: 753-759.
- Waheed, A., Hafiz, I. A., Qadir, G., Murtaza, G., Mahmood, T. and Ashraf, M. (2006) Effect of salinity on germination, growth, yield, ionic balance and solute composition of pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill. sp.). Pakistan Journal of Botany 38: 1103-1117.
- Wong, K. C., Ong, K. S. and Lim, C. L. (2006) Composition of the essential oil of rhizomes of *Kaempferia Galanga* L. Flavour and Fragrances Journal 7(5): 263-266.
- Yaniv, Z. and Paleitch, D. (1982) Effect of drought on the secondary metabolites of medicinal and aromatic plants. In: Cultivation and utilization of medicinal plants (Eds. Atal, C. K. and Kapur, B. M.) 1: 1-12. Council of Scientific and Industrial Research, Jammu-Tawi.
- Yemm, E. W. and Willis, A. J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemistry 57: 508-514.
- Zarrini, G., Bahari-Delgosha, Z., Mollazadeh-Moghaddam, K. and Shahverdi, A. R. (2010) Post-antibacterial effect of thymol. Pharmaceutical Biology 48(6): 633-636.
- Zhang, R. H., Li, J., Guo, S. R. and Tezuka, T. (2009) Effects of exogenous putrescine on gas exchange characteristics and chlorophyll fluorescence of NaCl-stressed cucumber seedlings. Photosynthesis Research 100: 155-162.



## اثر سیلیکون و نانوسیلیکون در کاهش صدمات ناشی از تنش شوری بر گیاهچه ذرت

حمیدرضا زارع، زهره قنبرزاده، آسیه بهداد و ساسان محسن‌زاده \*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

تنش شوری بازدهی محصولات کشاورزی مانند ذرت به عنوان یکی از غلات مهم را کاهش می‌دهد. با توجه به این که سیلیکون دومین عنصر فراوان در خاک است و موجب کاهش تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان می‌شود، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سیلیکون و نانوسیلیکون به عنوان بهبود دهنده تنش شوری در گیاه ذرت (*Zea mays*) است. بدین منظور، بر هم کنش اثر غلظت‌های مختلف شوری (۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار)، سیلیکون و نانوسیلیکون (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در قالب آزمایش‌های فاکتوریل در سه تکرار بررسی شد. نتایج نشان داد که شوری به طور معنی‌داری شاخص‌های رشد ریشه و اندام هوایی، میزان رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید، پروتئین و پتاسیم را نسبت به شاهد کاهش داد و تیمار گیاه با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب کاهش آثار منفی تنش شوری و موجب افزایش میزان شاخص‌های رشد شد. همچنین، در اثر تنش شوری افزایش معنی‌دار میزان پرولین، آنتوسیانین، کربوهیدرات محلول، پراکسیداسیون لیپید و فعالیت کاتالاز مشاهده شد که تیمار با سیلیکون و نانوسیلیکون آثار تنش شوری و در نتیجه میزان شاخص‌های رشد را کاهش داد. بیشترین اثر بهبوددهندگی در تمام شاخص‌های بررسی شده، تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوسیلیکون بود. بنابراین، استفاده از این عنصر به عنوان کاهش دهنده آثار منفی تنش شوری ذرت پیشنهاد می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** تنش شوری، ذرت، سیلیکون، نانوسیلیکون

### مقدمه

عنوان تغذیه چهارپایان است، اما تنش شوری کاهش

بازدهی این محصول را به دنبال دارد (Hussain *et al.*,

2010). شوری آب و خاک یکی از موانع و

ذرت یکی از غلات مهم با مصارف غذایی و تولید

روغن مورد نیاز انسان و همچنین در سطح جهانی به

\* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mohsenzadeh@susc.ac.ir شماره تماس: ۰۷۱۳۶۱۳۷۳۱۳

سیلیکون (Si) دومین عنصر فراوان در خاک است اما در بسیاری از گیاهان به عنوان یک عنصر ضروری مطرح نیست. به تازگی مطالعات زیادی نشان داده است که افزودن Si به گیاهان تیمار شده می‌تواند به طور چشمگیری تنش‌های زیستی و غیر زیستی نظیر: تنش فلزات سنگین، نمک، خشکی، سرما و یخ‌زدگی را کاهش دهد و آثار مفیدی بر رشد و تولید گیاهان داشته باشد (Liang et al., 2007؛ Mohsenzadeh et al., 2011؛ Shahrtash and Mohsenzadeh, 2011؛ Mohsenzadeh et al., 2012). اخیراً نقش کاهشی سیلیکون در تنش شوری مورد توجه قرار گرفته است. افزون بر این، برخی از مطالعات نشان داده است که سیلیکون در کاهش شوری در گونه‌های گیاهی گوناگون از قبیل: جو (Liang et al., 2003)، ذرت (Moussa, 2006) و گندم (Tuna et al., 2008) مؤثر است. سیلیکون با افزایش فعالیت فتوسنتزی، بهبود وضعیت آب، تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی و کاهش جذب سدیم یا افزایش وابسته به  $H^+$ -ATPase پتاسیم در اندام هوایی، تحمل به تنش شوری را افزایش می‌دهد (Rahimi et al.; Kiani Chalmardi et al., 2012؛ Liang et al., 2012). همچنین نشان داده شده است که سیلیکون احتمالاً سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز را فعال اما غلظت مالون‌دی‌آلدئید را در گیاهان جو، گوجه‌فرنگی و ذرت کاهش داده است (Liang et al., 2003؛ Moussa, 2006).

امروزه استفاده از نانوذرات توسط بسیاری از پژوهشگران کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است، هرچند سازوکار عملکرد آنها به درستی شناخته نشده است (Haghighi et al., 2012). گزارش شده است که نانوذرات سیلیکون سبب افزایش فعالیت نیترات

محدودیت‌های تولید مناسب محصولات کشاورزی است (Behzadifar et al., 2013). شوری در سطوح بالا سبب تنش اسمزی و یونی و به دنبال آن تخریب غشا، عدم توازن تغذیه‌ای، تغییر سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد، ممانعت آنزیمی و کاهش فتوسنتز شده که در نهایت مرگ گیاه را به دنبال دارد (Momeni et al., 2013). گیاهان تحت تنش، پتانسیل اسمزی را از طریق تجمع آمینو اسیدها، یونها، پرولین، پروتئین محلول و کربوهیدرات کاهش می‌دهند. این اسمولیت‌ها فشار اسمزی سیتوپلاسم را افزایش داده، جریان آب را در اندام‌ها و بافت‌های گیاهی بالا می‌برند (Ghafiyehsanj et al., 2013). مهم‌ترین فرآیندی که در گیاهان تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرد، فتوسنتز است. تنش شوری به بسته شده روزنه‌ها و به دنبال آن کاهش غلظت درون سلولی  $CO_2$  و در نتیجه کاهش هدایت روزنه‌ای و کاهش تثبیت  $CO_2$  منجر می‌شود (Saravanavel et al., 2011). تنش شوری نیز مانند سایر تنش‌های غیر زیستی، به افزایش رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو منجر می‌شود و می‌تواند باعث سمیت یونی و عدم تعادل یونی و تخریب غشا شده، در نتیجه باعث کاهش جذب  $CO_2$  و بسته شدن روزنه، کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و افزایش سطح پراکسیداسیون لیپید شود (Khan and Panda, 2008). گیاهان از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی که متشکل از آنزیم‌ها نظیر: سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گاپا کول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، دهیدرو آسکوربات ردوکتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و بخش‌های غیر آنزیمی شامل آسکوربات و گلوتاتیون است، برای مهار تجمع بیش از حد رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش استفاده می‌کنند (Shi et al., 2007).



جمع آوری و توسط ازت مایع فریز و در یخچال در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Shahrtash and Mohsenzadeh, 2011).

**اندازه گیری شاخص ها:** پس از برداشت، بلافاصله وزن تر اندام هوایی و ریشه با ترازوی دقیق اندازه گیری شد. پس از نگهداری اندام هوایی و ریشه گیاهچه ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۵ درجه سانتیگراد وزن خشک آنها نیز اندازه گیری شد. برای اندازه گیری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید بر حسب میلی گرم کلروفیل یا کاروتنوئید در گرم بافت تر برگ محاسبه گردید.

برای اندازه گیری پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳)، مقدار قندهای محلول از روش Nelson (۱۹۴۴) و آنتوسیانین برگ از روش Wanger (۱۹۷۹) استفاده شد. پراکسیداسیون لیپید (Heath and Packer, 1968)، فعالیت آنزیم کاتالاز (Aebi, 1984) و پروتئین کل (Bradford, 1976) نیز اندازه گیری شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Spekol، شرکت Analytic Jena، آلمان) برای اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی استفاده شد. سنجش پتاسیم با روش فلیم فوتومتری (Wang and Zhao, 1995) با استفاده از دستگاه فلیم فوتومتر (مدل PEP7، شرکت Jenway، انگلستان) انجام گردید.

**تحلیل آماری:** آزمایش ها با طرح بلوک های کاملاً تصادفی در قالب آزمایش های فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. برای تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶، برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

ردو کتاز در سویا می شود (Lu et al., 2002). در مطالعات دیگری نشان داده شد که یک میلی مولار نانوسیلیکون در کاهش آثار منفی تنش شوری بر ویژگی های رشد و جوانه زنی دانه های گوجه فرنگی اثر بهبوددهندگی داشته است. در این گیاه تیمار یک میلی مولار نانوسیلیکون تحت ۲۵ میلی مولار کلرید سدیم و ویژگی های جوانه زنی دانه شامل میزان جوانه زنی، طول ریشه و وزن خشک ریشه را افزایش داد اما ۲ میلی مولار نانوسیلیکون تحت ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم سبب کاهش چشمگیر ویژگی های جوانه زنی شد (Haghighi et al., 2012).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی نقش بهبوددهندگی سیلیکون و نانوسیلیکون بر گیاهچه ذرت در شرایط تنش شوری است.

## مواد و روش ها

**کشت بذر، تولید گیاهچه و تیمار شوری، سیلیکون و نانوسیلیکون:** بذر ذرت (*Zea mays* L.) به نام NS 6010 از شرکت آریا کشت پارس، شیراز تهیه گردید. ابتدا بذرها به مدت چهار روز در آب خیسانده شد و پس از جوانه زدن، بهترین بذرها را جوانه زده انتخاب و در پرلیت در عمق سه سانتی متری کشت و گیاهچه های یک ماهه تحت تیمار کلرید سدیم (۰ و ۱۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند. یک روز بعد، تیمار با محلول سیلیکون و نانوسیلیکون (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) اعمال شد. پس از دو هفته، آبیاری گلدان ها با آب مقطر و محلول هو گلند، روز پانزدهم مجدداً تیمار با کلرید سدیم و سپس سیلیکون و نانوسیلیکون بر گلدان های مورد نظر صورت گرفت و پس از حدود ده روز گیاهچه ها

## نتایج

**اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و نانوسیلیکون بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی:** بررسی داده‌ها نشان داد که در شرایط تنش شوری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه‌ها به طور معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) کاهش یافت. استفاده از سیلیکون و نانوسیلیکون، کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه را در شرایط تنش جبران کرد. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین اثر بهبوددهندگی وزن تر و

خشک اندام هوایی در شرایط تنش به ترتیب مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با میانگین ۱۰/۳ و ۲/۳ گرم و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر سیلیکون با میانگین ۷/۸۳ و ۰/۶۸ گرم بود. بیشترین اثر بهبوددهندگی وزن تر و خشک ریشه نیز به ترتیب در تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با میانگین ۳/۰۶ و ۱/۰۶ گرم و کمترین آن در تیمار ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر سیلیکون با میانگین ۱/۱۳ و ۰/۶ گرم مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- تغییرات شاخص‌های رشد گیاه ذرت در تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

شاخص‌های رشد					
تیمار کلرید سدیم (میلی مولار)	تیمار Si و NSi (میلی گرم بر میلی لیتر)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
۰	۰ Si	۱۰/۸۷±۰/۰۳ g	۳/۶±۰/۰۲ g	۳/۶۷±۰/۰۹ g	۱/۲۱±۰/۰۰۹ g
۵۰	۵۰ Si	۱۱/۷±۰/۰۶ f	۳/۸۹±۰/۰۵ f	۴/۰۷±۰/۰۷ f	۱/۳۲±۰/۰۰۶ f
۱۰۰	۱۰۰ Si	۱۲/۸۳±۰/۰۳ d	۴/۴۷±۰/۰۰۶ d	۵/۱±۰/۰۶ d	۱/۶۴±۰/۰۰۹ d
۱۵۰	۱۵۰ Si	۱۳/۷۷±۰/۰۷ b	۵/۲۶±۰/۰۳ b	۶/۰۷±۰/۰۳ b	۲/۰۲±۰/۰۰۳ b
۵۰	۵۰ NSi	۱۲/۲±۰/۰۰۶ e	۴/۱۵±۰/۰۱ e	۴/۶±۰/۰۰۶ e	۱/۴۶±۰/۰۰۷ e
۱۰۰	۱۰۰ NSi	۱۳/۳۳±۰/۰۳ c	۴/۸۱±۰/۰۴ c	۵/۵۷±۰/۰۷ c	۱/۸۱±۰/۰۳۵ c
۱۵۰	۱۵۰ NSi	۱۴/۴۷±۰/۱۲ a	۵/۵۲±۰/۰۴ a	۶/۶۳±۰/۰۹ a	۲/۱۵±۰/۰۰۹ a
۰	۰ Si	۴/۶۷±۰/۰۰۹ n	۱/۹۳±۰/۰۱ n	۰/۹۶±۰/۰۰۳ n	۰/۴۲±۰/۰۱۲ n
۵۰	۵۰ Si	۶/۸۰±۰/۰۰۶ m	۲/۳±۰/۰۱۸ m	۱/۱۳±۰/۰۰۳ m	۰/۶±۰/۰۰۰۶ m
۱۰۰	۱۰۰ Si	۸/۳۰±۰/۰۰۶ k	۲/۹۳±۰/۰۰۲ k	۱/۷۳±۰/۰۰۷ k	۰/۷۷±۰/۰۰۰۷ k
۱۵۰	۱۵۰ Si	۹/۸۳±۰/۰۰۳ i	۳/۲۶±۰/۰۰۲ i	۲/۶±۰ i	۰/۹۱±۰/۰۰۰۹ i
۵۰	۵۰ NSi	۷/۸۳±۰/۰۰۳ l	۲/۶۲±۰/۰۰۲ l	۱/۳۸±۰/۰۰۲ l	۰/۶۸±۰/۰۰۰۷ l
۱۰۰	۱۰۰ NSi	۹/۱۰±۰/۰۰۶ j	۳/۱۳±۰/۰۰۲ j	۲/۱۳±۰/۰۰۷ j	۰/۸۲±۰/۰۰۰۹ j
۱۵۰	۱۵۰ NSi	۱۰/۳±۰/۰۰۶ h	۳/۴±۰/۰۰۱ h	۳/۰۷±۰/۰۰۳ h	۱/۰۶±۰/۰۰۱ h

**اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و نانوسیلیکون بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید:** نتایج نشان داد که در شرایط تنش شوری، میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید به ترتیب ۴۲/۴۱ و ۴۹/۹۷ درصد نسبت به شاهد کاهش دارد. تیمار غلظت‌های مختلف سیلیکون و نانوسیلیکون کاهش کلروفیل و کاروتنوئید حاصل از تنش را جبران کرد. بیشترین اثر

بهبوددهندگی در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون به ترتیب با افزایش ۳۸/۳۹ و ۴۱/۴۷ درصدی نسبت به تیمار ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کلرید سدیم مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲).

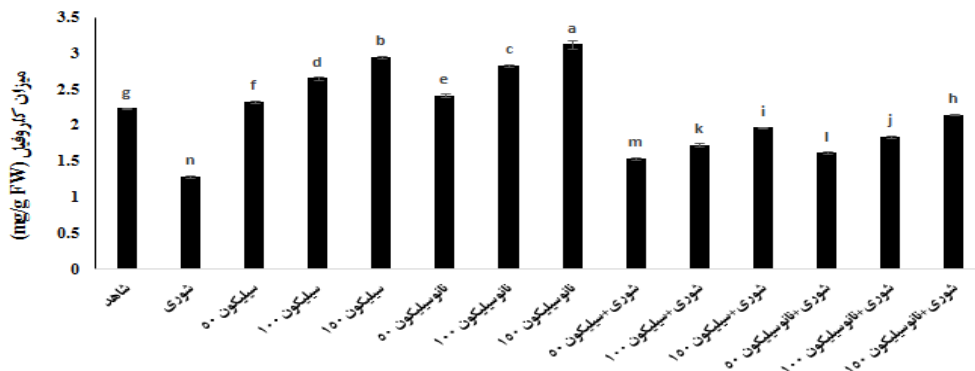
## اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

## نانوسیلیکون بر میزان اسید آمینه پرولین برگ: نتایج

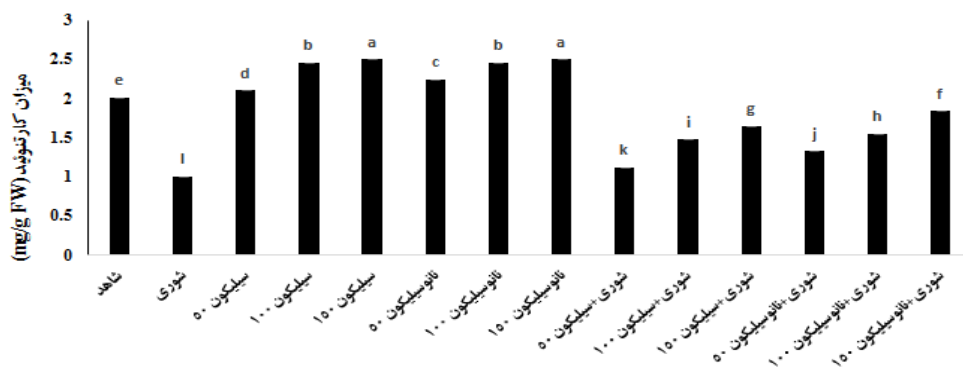
حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که میزان پرولین در

شرایط تنش شوری نسبت به شاهد به طور معنی داری (در سطح ۵ درصد) افزایش یافت و تیمار گیاه تحت تنش شوری با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب کاهش پرولین (در سطح ۵ درصد) شد. بیشترین کاهش مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با میانگین ۴۵/۱۸ میکرومول بر گرم وزن تر بود (شکل ۳).

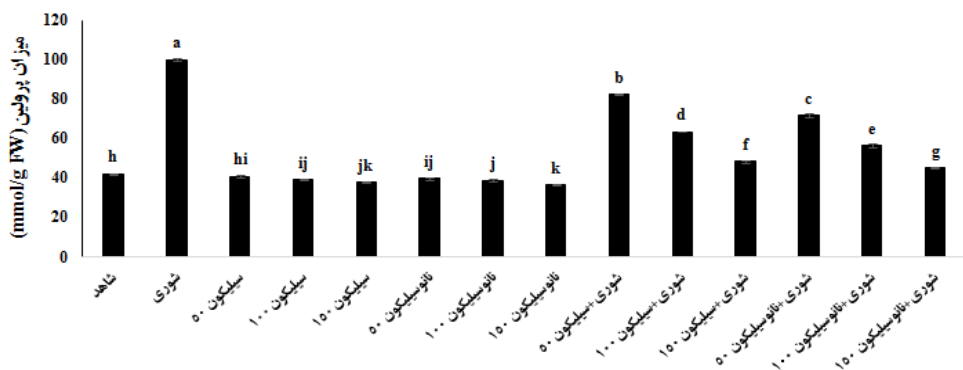
شرایط تنش شوری نسبت به شاهد به طور معنی داری (در سطح ۵ درصد) افزایش یافت و تیمار گیاه تحت تنش شوری با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب کاهش پرولین (در سطح ۵ درصد) شد. بیشترین کاهش مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با میانگین ۴۵/۱۸ میکرومول بر گرم وزن تر بود (شکل ۳).



شکل ۱- تغییرات کلروفیل گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



شکل ۲- تغییرات کاروتنوئید گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



شکل ۳- تغییرات پرولین گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.

تیمار ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر سیلیکون و نانوسیلیکون بود و تفاوت معنی داری بین این دو تیمار مشاهده نشد (شکل ۶).

#### اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

**نانوسیلیکون بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: بررسی** نتایج نشان داد که تنش شوری سبب افزایش (در سطح ۵ درصد) میزان فعالیت کاتالاز شده، تیمار گیاهچه تحت تنش شوری با سیلیکون و نانوسیلیکون میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش داد. بیشترین و کمترین میزان فعالیت کاتالاز در گیاهچه تحت تنش شوری تیمار شده با سیلیکون و نانوسیلیکون به ترتیب در تیمار ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر سیلیکون با ۶/۵۲ درصد و تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با ۲۲/۱۷ درصد مشاهده شد (شکل ۷).

#### اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

**نانوسیلیکون بر میزان پروتئین: بررسی** نتایج نشان داد که تنش شوری نسبت به شاهد سبب کاهش (در سطح ۵ درصد) میزان پروتئین در گیاهچه ذرت شد و تیمار با سیلیکون آثار تنش شوری را کاهش داد. بیشترین و کمترین اثر بهبوددهندگی تنش شوری به ترتیب در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با ۹۲/۵۵ درصد و غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر سیلیکون با ۱۷/۴۳ درصد مشاهده شد (شکل ۸).

#### اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

**نانوسیلیکون بر میزان پتاسیم: نتایج** حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که میزان پتاسیم در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد به طور معنی داری (در سطح ۵ درصد) کاهش یافت. تیمار گیاه تحت تنش شوری با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب افزایش میزان پتاسیم شد، به طوری

#### اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

**نانوسیلیکون بر میزان کربوهیدرات محلول: نتایج** حاصل از پژوهش حاضر نشان داد کربوهیدرات محلول در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد (در سطح ۵ درصد) افزایش یافت. تیمار گیاه تحت تنش شوری با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب کاهش معنی دار کربوهیدرات (در سطح ۵ درصد) شد و بیشترین کاهش مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با ۵۱/۵۱ درصد بود (شکل ۴).

#### اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

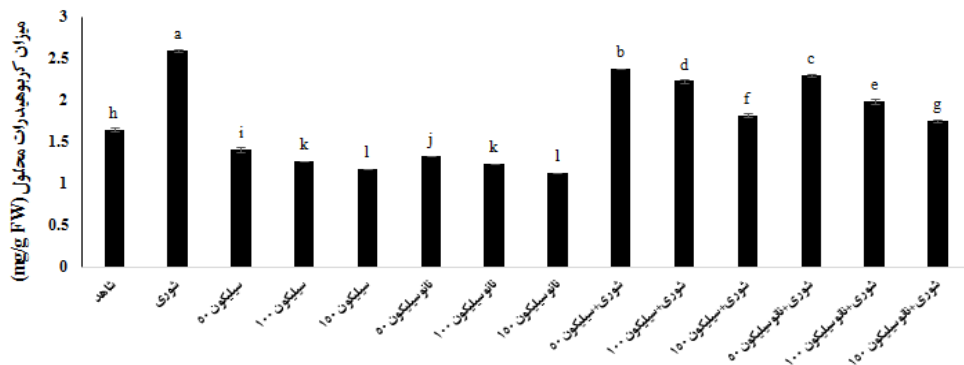
**نانوسیلیکون بر آنتوسیانین: بررسی** و تحلیل داده‌ها نشان داد که تیمار غلظت‌های مختلف سیلیکون و نانوسیلیکون اثر تنش شوری را کاهش (در سطح ۵ درصد) و میزان تجمع آنتوسیانین را کاهش می‌دهد. بیشترین کاهش اثر تنش شوری در تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با ۴۳/۷ درصد کاهش مشاهده شد. تیمار گیاه با سیلیکون و نانوسیلیکون بدون اثر شوری میزان آنتوسیانین را نسبت به شاهد کاهش داد و بیشترین اثر کاهشی مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون بود (شکل ۵).

#### اثر شوری و غلظت‌های مختلف سیلیکون و

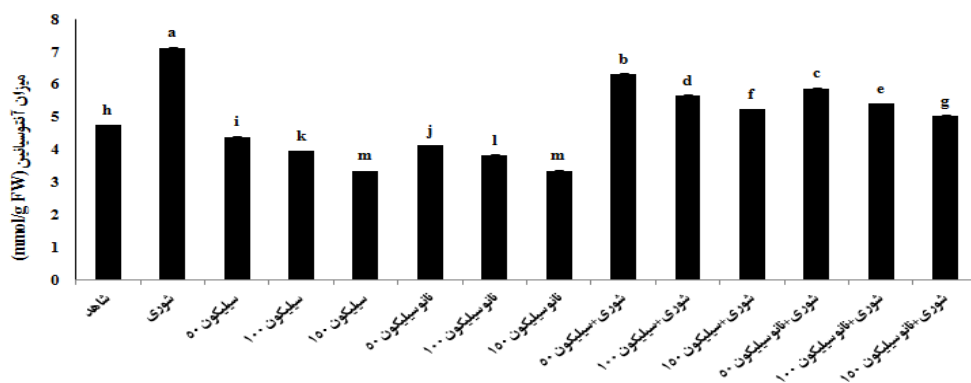
**نانوسیلیکون بر میزان پراکسیداسیون لیپید: بررسی** داده‌ها نشان داد که در شرایط تنش شوری میزان پراکسیداسیون لیپید به طور معنی داری (در سطح ۵ درصد) نسبت به شاهد افزایش یافت. تیمار گیاه تحت تنش با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب کاهش اثر شوری شد و بیشترین اثر کاهشی مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با ۵۸/۴ درصد کاهش بود. کمترین میزان پراکسیداسیون لیپید در

درصد افزایش و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر سیلیکون با ۱۸/۱۸ درصد مشاهده شد (شکل ۹).

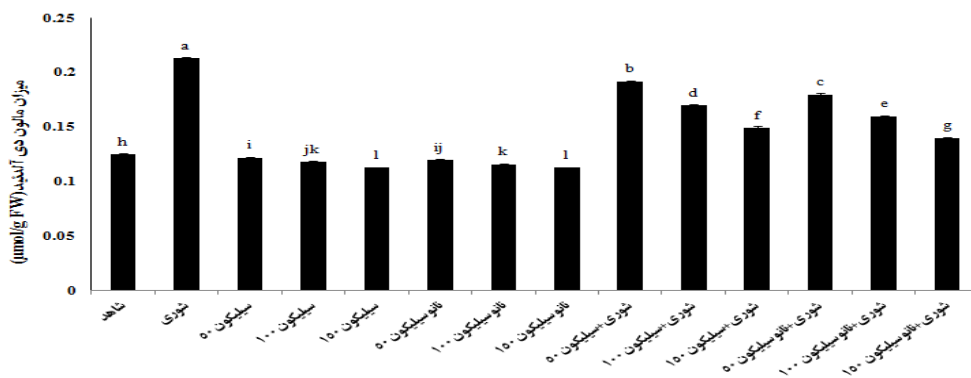
که بیشترین و کمترین اثر بهبوددهندگی تنش شوری در تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانوسیلیکون با ۸۱/۸



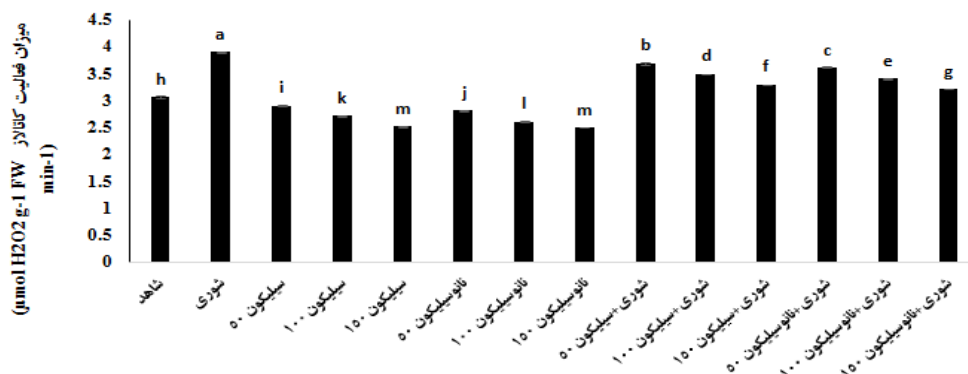
شکل ۴- تغییرات کربوهیدرات محلول گیاه ذرت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



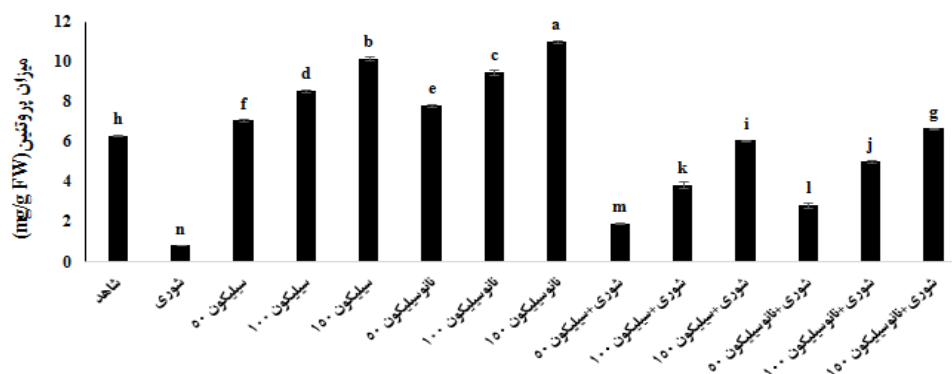
شکل ۵- تغییرات آنتوسیانین گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



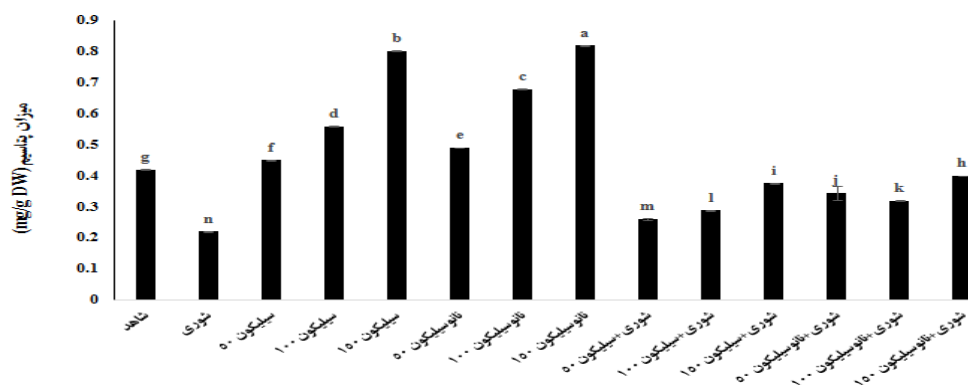
شکل ۶- تغییرات مالون دی آلدئید گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



شکل ۷- تغییرات کاتالاز گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



شکل ۸- تغییرات پروتئین گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.



شکل ۹- تغییرات پروتئین گیاه ذرت تحت تیمارهای مختلف کلرید سدیم، سیلیکون و نانوسیلیکون. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.

نیمه خشک در معرض تنش شوری هستند. علت این تنش در شوری آب یا خاک و نحوه آبیاری است

### بحث

محصولات زراعی در بسیاری از نواحی خشک و

تنش شوری را بهبود می‌بخشد (Haghighi and Pessarakli, 2013).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش شوری میزان کلروفیل و کاروتنوئید گیاهچه ذرت را در مقایسه با شاهد کاهش داد، اما تیمار گیاهچه تحت تنش با سیلیکون و نانوسیلیکون موجب بهبود آثار تنش و افزایش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید شد. نتایج مشابهی در گیاه *Solanum lycopersicum* L. مشاهده شده است (Haghighi and Pessarakli, 2013). کاهش میزان کلروفیل به علت کاهش سطح برگ، افزایش اکسید شدن و کاهش جذب نیتروژن به عنوان عنصر معدنی مهم در سنتز کلروفیل در گیاهان تحت تنش شوری است (Hajiboland and Cheraghvareh, 2014). تنش شوری با تأثیر بر عوامل روزنه‌ای باعث کاهش ورود دی اکسید کربن به درون سلول‌های برگ می‌شود، در نتیجه موجب کاهش فعالیت فتوشیمیایی، تولید رادیکال‌های آزاد در کلروپلاست و کاهش کلروفیل می‌شود. (Haghighi and Pessarakli, 2013). این امر پیشنهاد می‌کند که اضافه شدن سیلیکون و نانوسیلیکون می‌تواند با سمیت‌زدایی گونه‌های رادیکال آزاد القا شده تحت تنش شوری، سیستم دفاعی گیاه را بهبود بخشد و کارآیی فتوشیمیایی فتوسنتز II را افزایش دهد (Mateos-Naranjo et al., 2013; Hajiboland and Cheraghvareh, 2014). پرولین یکی از اسمولیت‌های مهم است که سبب سازگاری اسمزی شده و تجمع آن در پاسخ به تنش اسمزی به طور عمده گزارش شده است (Ashraf and Foolad, 2007). در پژوهش حاضر، افزایش مقدار پرولین در برگ‌های ذرت تحت تنش شوری مشاهده

(Ashraf et al., Parvaiz and Satyawati, 2008) (2010). تنش شوری سبب کاهش شدید رشد ریشه و اندام هوایی در گیاهان حساس می‌شود (Parvaiz and Satyawati, 2008). شواهد فراوانی در دست است که نشان می‌دهد زمانی که سیلیکون در اختیار گیاهان قرار گیرد نقش چشمگیری در رشد، تغذیه معدنی، مقاومت مکانیکی و مقاومت در برابر تنش‌های گوناگون دارد (Farooq et al., 2009). مطالعات Ashraf و همکاران (۲۰۱۳) کاهش وزن خشک ریشه و ساقه چهار ژنوتیپ نیشکر را در حضور کلرید سدیم به علت سمیت ناشی از یون سدیم نشان داد. آنها گزارش کردند که سیلیکون به علت کاهش جذب و انتقال  $\text{Na}^+$  از ریشه به اندام هوایی آثار مضر کلرید سدیم را کاهش داده، رشد گیاه نیشکر را بهبود می‌بخشد (Liang et al., 2007). در پژوهش حاضر نیز کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاهچه ذرت در اثر شوری مشاهده شد و تیمار گیاهچه ذرت با سیلیکون و نانوسیلیکون سبب بهبود شرایط تنش و افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گردید. در گیاه *Sorghum bicolor* مشاهده شد که استفاده از سیلیکون وزن تر اندام هوایی و ریشه را به ترتیب ۱۹/۲ و ۱۰ درصد نسبت به تنش شوری افزایش داد که با نتایج پژوهش حاضر هماهنگ است (Yin et al., 2013). اثر بهبوددهندگی سیلیکون بر وزن تر و خشک اندام هوایی در گیاه *Cucumis sativus* L. نیز گزارش شده است (Amirossadat et al., 2012). بررسی‌های انجام شده بر گیاه سیب‌زمینی شیرین تحت تنش شوری نشان داد که سیلیکون اضافه شده به مواد غذایی ممانعت رشد ایجاد شده در اثر

گندم (Pei *et al.*, 2010) و سورگوم (Sonobe *et al.*, 2009) نیز مشاهده شده است.

آنتوسیانین یک گروه از متابولیت‌های ثانویه است که در ایجاد رنگ، اثر متقابل میکروب-گیاه و تولید مثل نقش دارد (Sai kachout *et al.*, 2013). افزایش غلظت آنتوسیانین در گیاه *Nicotiana rustica* تحت تنش شوری مشاهده شده است که احتمالاً به علت سنتز بیشتر آن است، اما تیمار با سیلیکون اثر چشمگیری بر میزان آنتوسیانین در این گیاه تحت تنش شوری نداشت (Hajiboland and Cheraghvareh, 2014). در حالی که در پژوهش حاضر تنش شوری سبب افزایش میزان آنتوسیانین در گیاهچه ذرت شد و تیمار آن با سیلیکون و نانوسیلیکون اثر تنش شوری و میزان آنتوسیانین را کاهش داد. آنتوسیانین نقش مهمی در دفاع آنتی‌اکسیدانی در برگ‌های تحت تنش دارد و با کاهش آثار تنش به کمک سیلیکون میزان آن کاهش می‌یابد (Hajiboland and Cheraghvareh, 2014). طی تنش شوری افزایش آنتوسیانین برگ در گیاه گوجه‌فرنگی نیز مشاهده شده است (Borghesi *et al.*, 2011).

پراکسیداسیون لیپید غشا یکی از نشانه‌های تخریب غشا در سطح سلولی تحت شرایط تنش شوری است. تغییر در میزان مالون‌دی‌آلدئید به ویژه در دانه‌های روغنی اغلب نشانه‌ای از تخریب اکسیداتیو است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدئید به طور معنی‌داری در برگ‌های گیاهچه ذرت تحت تنش شوری در مقایسه با شاهد افزایش یافت. با اضافه شدن سیلیکون در مقایسه با نمونه‌های تحت شرایط تنش شوری، کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید در برگ‌های گیاهچه ذرت مشاهده شد. گزارش شده است که

شد، اما این افزایش با کاربرد سیلیکون کاهش یافت. این نتایج در گیاه سورگوم نیز مشاهده شده است (Yin *et al.*, 2013). نقش واقعی پرولین در سازگاری اسمزی بحث‌برانگیز است. در برخی از مطالعات، تجمع پرولین تحت تنش نشان‌دهنده افزایش تحمل گیاه نسبت به انواع حساس است (Nayyar and Walia, 2003). در حالی که تحقیقات دیگر پیشنهاد می‌کنند که تجمع پرولین نشانه آسیب تنش در گیاهان حساس نسبت به انواع تحمل‌کننده است (De Lacerda *et al.*, 2003). پرولین علاوه بر نقش اسمولیتی، می‌تواند به عنوان ذخیره کربن و نیتروژن برای مقابله با تنش مفید باشد. تأمین سیلیکون همیشه همراه با کاهش پرولین تحمل به تنش را بهبود می‌بخشد (Lee *et al.*, 2008؛ Tuna *et al.*, 2010؛ Pei *et al.*, 2010). سیلیکون با کاهش جذب سدیم توسط ریشه و همچنین کاهش انتقال آن به اندام هوایی، تنش اسمزی را کاهش می‌دهد، بنابراین پرولین نیز کاهش می‌یابد (Hajiboland and Cheraghvareh, 2014). کربوهیدرات‌های محلول یکی دیگر از اسمولیت‌های کلیدی در سازگاری اسمزی هستند. در پژوهش حاضر، میزان کربوهیدرات محلول در گیاهچه ذرت تحت تنش شوری نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد و تیمار گیاهچه تحت تنش با سیلیکون و نانوسیلیکون باعث کاهش میزان کربوهیدرات شد، این کاهش احتمالاً به دلیل مصرف کربوهیدرات محلول در شرایط تنش کمتر است. بررسی اثر سیلیکون بر گیاه سورگوم نشان داد که تیمار سیلیکون سبب افزایش مقدار کربوهیدرات محلول در مقایسه با تیمار بدون سیلیکون تحت تنش شوری شده است (Yin *et al.*, 2013). این نتایج در



(Moghadam Ali *et al.*, 2013). این نتایج پیشنهاد می‌کنند که آنزیم کاتالاز با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) فعال می‌شود و نوعی سازگاری برای گیاهچه ذرت تحت شرایط تنش است. کاربرد سیلیکون و نانوسیلیکون در گیاهچه ذرت در معرض تنش، از طریق کاهش اثر تنش شوری و رادیکال‌های آزاد، میزان فعالیت کاتالاز را کاهش می‌دهد. در گیاه آفتابگردان تحت تنش شوری تیمار شده با سیلیکون و نانوسیلیکون نیز میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به طور معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش شوری کاهش یافت (Moghadam Ali *et al.*, 2013).

در پژوهش حاضر، تنش شوری سبب کاهش معنی‌دار میزان پروتئین شد، تیمار گیاه با سیلیکون اثر تنش شوری را کاهش داد و سبب افزایش میزان پروتئین شد. نتایج مشابهی در گیاه *Borago officinalis* L. مشاهده شده است (Enteshari *et al.*, 2011). احتمالاً سیلیکون به دلیل کاهش تنش موجب افزایش مقدار پروتئین شده است.

گزارش شده است که سیلیکون توازن تغذیه‌ای گیاهان تحت تنش را بهبود می‌بخشد (Nwugo and Huerta, 2011). جذب و انتقال سدیم به ریشه به میزان زیادی با اضافه کردن سیلیکون به شرایط تنش شوری کاهش می‌یابد، بنابراین افزایش تحمل به تنش شوری توسط سیلیکون به جذب انتخابی و انتقال پتاسیم و سدیم توسط گیاهان نسبت داده می‌شود (Amirossadat *et al.*, 2012). سیلیکون با کاهش جریان‌ات آپوپلاستی، جذب و انتقال فلزات سنگین و نمک‌ها را از ریشه به اندام هوایی کاهش می‌دهد (Ma and Yamaji, 2006). بررسی‌های Liang و همکاران

کاربرد سیلیکون، پراکسیداسیون لیپید را در سلول‌های گیاه جو تحت تنش شوری کاهش داده است (Liang *et al.*, 2003). این نتایج پیشنهاد می‌کنند که سیلیکون شاید از ساختار غشای سلولی گیاهان در معرض تنش شوری محافظت و از تخریب آن ممانعت می‌کند. بنابراین، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تخریب اکسیداتیو گیاهچه‌های ذرت در معرض تنش شوری با اضافه شدن سیلیکون ممانعت می‌شود. به طور کلی، مشخص شده است که گیاهان در تنش شوری، با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها به کمک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از خود محافظت می‌کنند (Parvaiz and Satyawati, 2008). سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اصلی جهت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد هستند. سوپر اکسید دیسموتاز احتمالاً نقش مرکزی در دفاع علیه سمیت رادیکال‌های آزاد دارد (Ashraf, 2009). بر اساس گزارش‌های اولیه، در گیاه ذرت تحت تنش شوری، با افزایش آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز، نوعی حفاظت از تخریب صورت می‌گیرد (Parvaiz and Satyawati, 2008). این نتایج پیشنهاد می‌کنند که تنش شوری می‌تواند موجب تغییرات معنی‌داری در فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در متابولیسم رادیکال‌های آزاد شود (Wang *et al.*, 2010). در پژوهش حاضر، افزایش فعالیت کاتالاز تحت تنش شوری و کاهش فعالیت این آنزیم با کاربرد سیلیکون و نانوسیلیکون مشاهده شد. رادیکال‌های آزاد باعث افزایش تولید کاتالاز می‌شوند و کاهش میزان کاتالاز نشان‌دهنده کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد و بنابراین کاهش تخریب اکسیداتیو است

کودهای معمولی هستند زیرا باعث جذب بیشتر به وسیله گیاهان و آزادسازی سریع است. به همین علت، نسبت به کود معمولی ترجیح داده می‌شوند (Wurth, 2007)؛ (Rezaei *et al.*, 2010). عناصر نانو ذرات به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکی-شیمیایی در مقایسه با ذرات غیر نانو مرکز توجه بسیاری از پژوهشگران است (Monica and Cremonini, 2009). نانو ذرات سیلیکون اثر مستقیم و غیر مستقیم در بهبود رشد ریشه و اندام هوایی دارند (Siddiqui and Whaibi, 2014). نانو ذرات سیلیکون فشار تورگر و اندازه گیاه را از طریق بهبود کارایی مصرف آب و محتوای نسبی برگ افزایش می‌دهند. همچنین، نانو ذرات سیلیکون از طریق کاهش جذب سدیم، سمیت آن را کاهش و رشد گیاه را بهبود می‌دهند. کاربرد نانو ذرات سیلیکون، وزن تر و خشک اندام هوایی تحت شرایط شوری را کاهش می‌دهد (Kalteh *et al.*, 2014).

### جمع‌بندی

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، سیلیکون و نانوسیلیکون آثار تنش شوری را در گیاهچه ذرت بهبود بخشیده، سبب رشد و بقای بهتر گیاهچه‌های تحت تنش شوری شدند. همچنین، مشاهده شد که اثر بهبوددهندگی نانوسیلیکون بهتر از اثر سیلیکون بود. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود که از سیلیکون و نانوسیلیکون به عنوان بهبوددهنده آثار تنش شوری استفاده گردد.

### سپاسگزارى

نگارندگان از حوزه معاونت محترم پژوهش و

(۲۰۰۶) نشان داده است که افزودن سیلیکون، انتقال پتاسیم را افزایش داده، نسبت  $K^+/Na^+$  را با فعال کردن پمپ  $H^+-ATPase$  بهبود می‌بخشد. در پژوهش حاضر نیز میزان پتاسیم گیاهچه ذرت تیمار شده با سیلیکون به طور معنی داری نسبت به تنش شوری افزایش یافت و سیلیکون سبب بهبود اثر شوری شد. نتایج مشابهی در گیاهان (Mateos-Naranjo *et al.* *Spartina densiflora* (Ashraf *Saccharum officinarum* L. *et al.*, 2013) *et al.*, 2010) مشاهده شده است.

در شرایط بدون تنش تنها میزان کلروفیل و پروتئین کل و مقدار پتاسیم در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ نانوسیلیکون به طور معنی داری بیشتر از غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ سیلیکون است. اما در بررسی اثر نانوسیلیکون در کاهش آثار منفی تنش شوری، تمامی موارد به طور معنی داری بهتر از اثر سیلیکون با همان غلظت بود. نانو ذرات به علت اندازه کوچکشان ویژگی‌های منحصر به فردی را نشان می‌دهند. برای نمونه، آنها می‌توانند ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی را در مقایسه با مواد بزرگتر تغییر دهند. برخی مطالعات در مورد مقایسه اثر نانوسیلیکون و میکروسیلیکون نشان می‌دهد که نانوسیلیکون به دلیل اندازه کوچکتر بهتر منتقل و منتشر می‌شود (Chen *et al.*, 2004). آنها مساحت سطحی بیشتری نسبت به مواد بزرگتر دارند و به همین دلیل انحلال‌پذیری و واکنش‌پذیری بالاتری دارند (Ruffini and Cremonini, 2009). بنابراین، تأثیر بهتر نانوسیلیکون‌ها بر کاهش آثار منفی تنش شوری نسبت به سیلیکون‌ها، به علت همین ویژگی‌ها قابل توجیه است.

استفاده از عناصر نانو در تغذیه گیاهان یکی از نقش‌های نانو تکنولوژی است. نانو ذرات بسیار مؤثرتر از

فناوری دانشگاه شیراز به خاطر حمایت مالی از پژوهش حاضر، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

## منابع

- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Amirossadat, Z., Mohammadi Ghehsareh, A. and Mojiri, A. (2012) Impact of silicon on decreasing of salinity stress in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.) in soilless culture. *Journal of Biological Environmental Science* 6(17): 171-174.
- Ashraf, M. (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27: 84-93.
- Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress and resistance. *Environmental Experimental Botany* 59: 206-216.
- Ashraf, M., Rahmatullah, A. R., Ahmad, A. S., Bhatti, M., Afzal, A., Behzadifar, M., Chehrazi, M. and Aboutalebi, A. (2013) Effect of salt stress by using unconventional water on some morphological characters and ajmalicine alkaloid amount in the roots of *Catharanthus roseus* cvs. Rosea and Alba, *Annals of Biological Research* 4(8): 229-231.
- Ashraf, M., Rahmatullah, A., Ahmad, R., Bhatti, A. S., Afzal, M., Sarwar, A., Maqsood, M. A. and Kanwal, S. (2010) Amelioration of salt stress in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by supplying potassium and silicon in hydroponics. *Pedosphere* 20(2): 153-162.
- Bates, L. S. Waldron, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studied. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Behzadifar, M., Chehrazi, M. and Aboutalebi, A. (2013) Effect of salt stress by using unconventional water on some morphological characters and ajmalicine alkaloid amount in the roots of *Catharanthus roseus* cvs. Rosea and Alba. *Annals of Biological Research* 4(8): 229-231.
- Borghesi, E. Gonzalez-Miret, M. L. Escudero-Gilete, M. L. Malorgio, F. Heredia, F. J. and Meléndez-Martínez A. J. (2011) Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59(21): 11676-11682.
- 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* 74: 248-254.
- Chen, Y., Chen, J., Dong, J. and Jin, Y. (2004) Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats. *Toxicology and Industrial Health* 20(1-5): 21-27.
- De Lacerda, C. F. Cambraia, J. Oliva, M. A. Ruiz, H. A. and Prisco, J. T. (2003) Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 107-120.
- Enteshari, S., Alishavandi, R. and Delavar, K. (2011) Interactive effects of silicon and NaCl on some physiological and biochemical parameters in *Borago officinalis* L.. *Iranian Journal of Plant Physiology* 2(1): 315-320.
- Farooq, M., Wahid, A. Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Ghafiyehsanj, E., Dilmaghani, K. and Hekmat Shoar, H. (2013) The effects of salicylic acid on some of biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Annals of Biological Research* 4(6): 242-248.

- Haghighi, M. and Pessaraki, M. (2013) Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherrytomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae* 161: 111-117.
- Haghighi, M., Afifipour, Z. and Mozafarian, M. (2012) The effect of N-Si on tomato seedgermination under salinity levels. *Journal of Biology Environment Sciences* 6(16): 87-90.
- Hajiboland, R. and Cheraghvareh, L. (2014) Influence of Si supplementation on growth and some physiological and biochemical parameters in salt-stressed tobacco (*Nicotiana rustica* L.) plants. *Journal of Sciences* 25(3): 205-217.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1): 189-198.
- Hussain, K., Majeed, A., Nawaz, K. and Nisar, M. F. (2010) Changes in morphological attributes of maize (*Zea mays* L.) under NaCl salinity. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 8(2): 230-232.
- Kalteh, M., Alipour, Z., Ashraf, S., Marashi Aliabadi, M. and Falah, A. (2014) Effects of silica Nanoparticles on Basil (*Ocimum basilicum*) under salinity stress. *Journal of Chemical Health Risks* 4(3): 49-55.
- Khan, M. H. and Panda, S. K. (2008) Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Plant Physiology* 30: 81-89.
- Kiani Chalmardi, Z., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H. R. (2012) Evaluation of the effects of silicon nutrition on alleviation of iron deficiency in rice plants (*Oriza sativa* L.) with emphasis on growth and antioxidant enzymes activity. *Iranian Journal of Plant Biology* 4(14):74-61 (in Persian).
- Lee, S. K., Sohn, E. Y., Hamayun, M. Yoon, J. Y. and Lee, I. J. (2010) Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. *Agroforestry Systems* 80: 333-340.
- Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. and Ding, R: (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology* 160: 1157-1164.
- Liang, Y. C., Sun, W., Zhu, Y. G. and Christie, P. (2007) Mechanisms of silicon mediated alleviation of abiotic stress in higher plants: a review. *Environmental Pollution* 147: 422-428.
- Liang, Y. C., Zhang, W. H., Chen, Q. and Ding, R. X. (2006) Effects of silicon on tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase activity, fatty acid composition and fluidity in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany* 53: 29-37.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lu, C. M., Zhang, C. Y., Wen, J. Q. and Wu, G. R. (2002) Effects of nano material on germination and growth of soybean. *Soybean Sciences* 21(3): 168-171.
- Ma, J. F. and Yamaji, N. (2006) Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sciences* 11(8): 392-397.
- Mateos-Naranjo, E. Andrades-Moreno, L. and Davy, A. J. (2013) Silicon alleviates deleterious effects of high salinity on the halophytic grass *Spartina densiflora*. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 115-121.
- Moghadam Ali, M. A., Ramezani, A., Mansuri Far, S., Aslani, K. S., Moradi-Ghahderijani, M. M. and

- Jamian, S. S. (2013) Application of silicon ameliorates salinity stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6(20): 1367-1372.
- Mohsenzadeh, S., Shahrtash, M. and Mohabatkar, H. (2011) Interactive effects of salicylic acid and silicon on some physiological responses of cadmium-stressed maize seedlings. *Iranian Journal of Science and Technology* 201(1): 57-60.
- Mohsenzadeh, S., Shahrtash, M. and Teixeira de Silva, J. A. (2012) Silicon improves growth and alleviates toxicity of cadmium in maize seedling. *Plant Stress* 6(1): 39-43.
- Momeni, N., Arvin, M. J., Khagoei negad, G., Keramat, B. and Daneshmand, F. (2013) Effects of sodium chloride and salicylic acid on some photosynthetic parameters and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants. *Iranian Journal of Plant Biology* 5(15): 15-30 (in Persian).
- Monica, R. C. and Cremonini, R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62: 161-165.
- Moussa, H. R. (2006) Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Agriculture and Biology* 8(2): 293-297.
- Nayyar, H. and Walia, D. P. (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biological Plantarum* 46: 275-279.
- Nelson, N. (1944) A photometric adaption of the somogi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380.
- Nwugo, C. C. and Huerta, A. J. (2011) The effect of silicon on the leaf proteome of rice (*Oryza sativa* L.) plants under cadmium-stress. *Journal of Proteome Research* 10(2): 518-528.
- Parvaiz, A. and Satyawati, S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil and Environment* 54: 89-99.
- Pei, Z. F., Ming, D. F., Liu, D., Wan, G. L., Geng, X. X., Gong, H. J. and Zhou, W. J. (2010) Silicon improves the tolerance to water-deficit stress induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 106-115.
- Rahimi, R., Mohammakhani, A., Roohi, V. and Armand, N. (2012) Effects of salt stress and silicon nutrition on chlorophyll content, yield and yield components in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4(21): 1591-1595.
- Rezaei, R., Hoseini, S. M., Shabanali Fami, H. and Safa, L. (2010) Identification and analysis of barriers in the development of nanotechnology in Iran agriculture sector from the researchers point of view. *Sciences Technology Policy* 2(1): 17-26.
- Ruffini, C. M. and Cremonini, R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62(2): 161-165.
- Sai kachout, S., Jaffel Hamza, K., Karray bouraoui, N., Leclerc, J. C. and Ouerghi, Z. (2013) Salt-induced changes in antioxidative enzyme activities in shoot tissues of two atriplex varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 41(1): 115-121.
- Saravanavel, R., Ranganathan, R. and Anantharaman, P. (2011) Effect of sodium chloride on photosynthetic pigments and photosynthetic characteristics of *Avicennia Officinalis* seedlings. *Science and Technology* 3(4): 177-180.
- Shahrtash, M. and Mohsenzadeh, S. (2011) The effect of silicon on biochemical characteristics of maize seedling infected by *Pythium aphanidermatum* during periods of high temperature and humidity. *Asian Journal Experimental Biology Science* 2(1): 96-101.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 542-550.

- Siddiqui, M. H. and Whaibi, M. H. (2014) Role of nano-SiO<sub>2</sub> in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds. Saudi Journal of Biological Sciences 21: 13-17.
- Sonobe, K., Hattori, T., An, P., Tsuji, W., Eneji, E., Tanaka, K. and Shinobu, I. (2009) Diurnal variations in photosynthesis, stomatal conductance and leaf water relation in sorghum grown with or without silicon under water stress. Journal Plant Nutrition 32: 433-442.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Higgs, D., Murillo-Amador, B., Aydemir, S. and Girgin, A. R. (2008) Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. Environmental and Experimental Botany 62: 10-16.
- Wang, B. S. and Zhao, K. F. (1995) Comparison of extractive methods of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> in wheat leave. Plant Physiology Communications 31(1): 50-52.
- Wang, X., Ou-yang, C., Fan, Z., Gao, S., Chen, F. and Tang, L. (2010) Effects of exogenous silicon on seed germination and antioxidant enzyme activities of *Momordica charantia* under salt stress. Journal of Animal and Plant Sciences 6(3): 700-708.
- Wanger, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology 64: 88-93.
- Wurth, B. (2007) Emissions of engineered and unintentionally produced nanoparticles to the soil: an exposure assessment for Switzerland. PhD thesis, ETH Zurich University, Zürich, Switzerland.
- Yin, L., Wang, S., Li, J., Tanaka, K. and Oka, M. (2013) Application of silicon improves salt tolerance through ameliorating osmotic and ionic stresses in the seedling of *Sorghum bicolor*. Acta Physiology Plant 35: 3099-3107.

## ارتقای تحمل و بهبود وضعیت بذر یونجه (*Medicago sativa*) در شرایط تنش شوری تحت تأثیر زمان‌های متفاوت پرایمینگ با $\text{KNO}_3$ و $\text{Na}_2\text{SiO}_3$

کیومرث آرمندتراب<sup>۱</sup>، مریم مددکار حق‌جو<sup>۱\*</sup> و احمد اسماعیلی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۲</sup> گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

### چکیده

مقابله با آثار مخرب تنش شوری که به طور پیش‌رونده منابع آبی و خاکی مناسب برای پرورش گیاهان را محدود نموده، از طریق ارتقای سطح تحمل بذر و گیاهچه میسر است. در پژوهش حاضر، تأثیر پرایمینگ به صورت ترکیب‌های تیماری  $\text{KNO}_3$  و  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در زمان‌های ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت، بر پاسخ رقم همدانی بذر یونجه، به تنش شوری (۲۰۰ میلی مولار) بررسی گردید. شوری سبب افت اغلب شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذور و گیاهچه گردید، در حالی که پرایمینگ ۳ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  سبب افزایش درصد جوانه‌زنی و پرایمینگ ۳، ۶ و ۹ ساعته  $\text{KNO}_3$  سبب افزایش درصد و ضریب سرعت جوانه‌زنی در بذور تحت تنش در مقایسه با شاهد شد. بهبود میانگین سرعت و زمان جوانه‌زنی در تنش، توسط  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ۶ ساعته و کلیه سطوح زمانی  $\text{KNO}_3$  و افزایش شاخص و یگور یک توسط  $\text{KNO}_3$  ۳ ساعته مشاهده شد. پرایمینگ  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ۳، ۶ و ۹ ساعته و تمام تیمارهای  $\text{KNO}_3$  سبب کاهش زمان رسیدن به ۵۰ درصد کل جوانه‌زنی در شرایط تنش و در فقدان تنش، تیمارهای ۹ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$ ، سبب کاهش میانگین روزانه جوانه‌زنی و افزایش شاخص تیمسون و  $\text{KNO}_3$  ۶ و ۹ ساعته سبب بهبود ضریب یکنواختی گردیدند. تیمارهای  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$  ۱۲ ساعته، باعث بدتر شدن وضعیت و کاهش درصد جوانه‌زنی، افت و یگور یک و دو و کاهش سرعت جوانه‌زنی شدند.  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در تمام سطوح و  $\text{KNO}_3$  ۹ و ۱۲ ساعته، سبب کاهش وزن خشک ساقه‌چه در تنش شدند. پرولین تنها تحت تأثیر  $\text{KNO}_3$  در تنش افزایش یافت و کلروفیل‌ها بر اثر شوری کاهش و تحت تأثیر پرایمینگ افزایش یافتند. به طور کلی، پرایمینگ سبب افزایش تحمل به شوری گردید و ترکیب‌های تیماری با زمان‌های کوتاه‌تر در این رابطه مؤثرتر بودند.

**واژه‌های کلیدی:** پرایمینگ، تنش شوری، سدیم متاسیلیکات، نترات پتاسیم، یونجه همدانی

## مقدمه

یونجه، مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای جهان و بومی ایران است که به جهت خوش‌خوراکی، دامنه وسیع سازگاری با محیط و تولید محصول زیاد و با کیفیت، ملکه نباتات نام گرفته است. گیاه یونجه نقش مهمی را در تأمین علوفه خشک و چرای مستقیم دام داشته و در اصلاح مراتع سردسیری و دیم‌زارهای پرشیب و کم‌بازده مورد استفاده است (Summers, 1998).

سطح زیر کشت یونجه در دنیا حدود ۳۲ میلیون هکتار است که سهم ایران در یک دهه (۱۳۷۳ تا ۱۳۸۲) در حدود ۶۰۰ هزار هکتار بوده است (www.maj.ir, 2015). بررسی‌ها نشان داده است که جوانه‌زنی در واقع یک مرحله حساس است که تراکم و جمعیت گیاه کشت شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به بیان دیگر، مراحل رشد اولیه گیاه حساس‌تر از مراحل بعدی آن هستند (Keiffer and Ungar, 1997).

تنش شوری، یک تنش غیرزیستی مهم دارای تأثیرات اساسی بر جوانه‌زنی است و از این طریق می‌تواند خسارات اقتصادی قابل توجهی را به تولید محصولات زراعی وارد آورد (Kayani et al., 1990). Dobrenz و همکاران (۱۹۸۶) گزارش نموده‌اند که گیاه یونجه در مرحله جوانه‌زنی بذری بسیار حساس به شوری است. گرچه این حساسیت می‌تواند در میان گونه‌ها و اکوتیپ‌های یونجه از درجات مختلفی برخوردار باشد (Torabi, 2011).

از مجموع ۶/۸ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی ایران که دارای خاک‌هایی با غلظت‌های مختلف شوری است، حدود ۴/۳ میلیون هکتار، منحصراً دارای مشکل

شوری است و حدود ۲/۵ میلیون هکتار علاوه بر شوری، مشکلاتی در رابطه با جنس خاک، معضل فرسایش و کمبود آب‌های زیرزمینی را نیز دارا می‌باشند (Moemeni, 2010).

منابع بسیاری بر اهمیت فستوتز در رابطه با متابولیسم فعال و مقدار انرژی و قند تولید شده در گیاه دلالت دارند و مقدار کلروفیل را در شرایط تنش شوری به عنوان یک شاخص حساس برای پی‌بردن به وضعیت متابولیکی سلول می‌دانند (Chutipaijit et al., 2011).

با توجه به اهمیت ویژه یونجه در تأمین علوفه دامی، تثبیت زیستی نیتروژن هوا و نیاز به افزایش تولید و توسعه زراعت یونجه، و نیز با توجه به این که حساسیت یونجه به شوری در مرحله جوانه‌زنی، در کاهش کمیّت و کیفیت محصول به شدت مؤثر است، از روش پرایمینگ به منظور افزایش آمادگی بذر در مقابله با تنش شوری استفاده شد.

اساس این روش بر آن است که بذور پیش از کاشت، در واقع با یک مرحله هیدراتاسیون محدود تیمار می‌شوند که از این روش اغلب برای افزایش کارایی گیاهان زراعی استفاده می‌شود (Bradford, 1986). در پرایمینگ، آغشته شدن کامل بذور به آب برای ممانعت از خروج ریشه‌چه صورت نمی‌گیرد، بلکه آغشتگی محدود و کوتاه‌مدت به آب، توسط راهکارهای مختلف نظیر: هیدروپرایمینگ، یا مواجهه با شرایط پتانسیل‌های آبی پایین نظیر اسموپرایمینگ (Chen and Arora, 2013) یا هالوپرایمینگ، به صورت تیمار با نمک‌های غیر آلی نظیر:  $KNO_3$  (Afzal et al., 2011) و  $KH_2PO_4$  (Batoool et al., 2015) انجام می‌گیرد که در نتیجه آن،



در رابطه با وقوع و پیشبرد وقایع سیگنالی در حین پرایمینگ، برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر سالیسیلیک اسید، در واقع به عنوان یک شبه هورمون، می‌تواند سبب افزایش آنزیم‌های  $\text{MPK}_3$  و  $\text{MPK}_6$  (Nakagami *et al.*, 2005) و همچنین موجب بالا نگه داشتن نسبت هورمون اکسین و سیتوکینین برای ممانعت از کاهش تقسیم سلولی گردد، و از این طریق در مقابله سلول با تنش‌های غیرزیستی ایفای نقش نماید (Singh and Ushu, 2003).

بذور پرایم شده با Si در زمان کاشت، افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول و نیز بالا نگه‌داشتن محتوای آب سلول را نشان می‌دهند که در نتیجه امکان مقابله بذر با تنش را افزایش می‌دهد (Farooq *et al.*, 2008). گزارش شده است که هالوپرایمینگ بذور با نمک‌ها نیز ممکن است بتواند از طریق جذب مقداری نمک به درون بذور و بنابراین کاهش پتانسیل اسمزی درونی (Zhang *et al.*, 2010)، با افزایش دادن مقدار کربوهیدرات‌ها و نیز اسمولیت‌های سازگار، در القای مقاومت بذر به تنش شوری مؤثر باشد (Jisha and Puthur, 2014).

بررسی منابع موجود در رابطه با یونجه، نشان می‌دهد که هیدروپرایم و اسموپرایم بذور یونجه با برخی مواد نظیر: مانیتول، کربنات سدیم، سالیسیلیک اسید و نیز تیمار با یک قارچ کش (Triadimefon)، به افزایش مقاومت در برابر تنش شوری منجر شده است (Torabian, 2010؛ Arab؛ Najari *et al.*, 2011؛ Amooaghaei, 2011 and Ehsanpour, 2012. از سوی دیگر، بررسی توصیه‌های ترویجی به کشاورزان گویای آن است که به

بذور را به سمت و سوی جوانه‌زنی، تا پیش از مرحله خروج ریشه‌چه، سوق می‌دهد (Ashraf and Foolad, 2005). پیشرفت این مراحل در واقع با به راه افتادن وقایع درون سلولی و ساخت و ساز سلولی نظیر افزایش سنتز پروتئین‌هایی موسوم به Type II که در جوانه‌زنی دخیل هستند، انجام می‌شود و بذور پس از کاشت، در سرعت جوانه‌زنی و یکنواختی سبز شدن بهبود نشان می‌دهند. از سوی دیگر، در زمان پرایمینگ، هم به علت روبرو شدن بذور با یک تنش ملایم اولیه و هم به علت پیشرفت فرآیندهای ساخت و ساز سلول در مسیر جوانه‌زنی، بذور مقاومت بیشتری نیز نسبت به تنش‌ها به دست می‌آورند که حتی با خشک شدن آنها، از دست نمی‌رود، و به اصطلاح به صورت خاطره پرایمینگ (priming memory) باقی می‌ماند. در واقع، فرآیندی به نام cross-tolerance که توسط تنش‌های غیرزیستی در هنگام پرایمینگ فعال می‌شود، می‌تواند از طریق پیشبرد فرآیندهای مولکولی و درون سلولی از جمله: بیان ژن‌ها و سنتز پروتئین‌های ویژه، سبب مقاومت بذور پرایم شده در مقابل تنش‌های محیطی در هنگام جوانه‌زنی گردد (Chen and Arora, 2013). گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر این که اسموپرایمینگ ممکن است بتواند از طریق تغییر در بیوسنتز هورمون‌ها (افزایش نسبت جیبرلیک اسید به آبسزیک اسید و اتیلن (Nakaune *et al.*, 2012) و به راه انداختن مراحل سیگنالی عمل نماید. اسموپرایمینگ همچنین می‌تواند از طریق فعال سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول در بهبود وضعیت سلول برای مقابله با تنش‌های بعدی مؤثر باشد (Chen and Arora, 2011؛ Wojtyla *et al.*, 2013).

غلظت‌های صفر (شاهد یا آب مقطر)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم تهیه شد. ابتدا بذور با محلول ویتاواکس با غلظت ۰/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شد و سپس در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی قرار گرفتند. مقدار ۶ میلی‌لیتر از آب مقطر استریل به نمونه شاهد و ۶ میلی‌لیتر از محلول‌های نمک کلرید سدیم با غلظت‌های مذکور به هر یک از پتری دیش‌های دیگر به عنوان تیمار افزوده شد. برای هر غلظت، تعداد چهار پتری دیش، هر یک به عنوان یک تکرار و هر یک حاوی ۴۰ عدد بذر سالم در نظر گرفته شد، همچنین گروه شاهد نیز در چهار تکرار تهیه گردید. پتری دیش‌های محتوی بذور در شرایط فتوپریودیک، دوره روشنایی ۱۶ ساعت در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتیگراد و طول دوره تاریکی ۸ ساعت در دمای  $17 \pm 2$  درجه سانتیگراد قرار داده شدند. جوانه‌زنی به طور مرتب و هر ۲۴ ساعت ارزیابی شد. خروج ریشه‌چه به اندازه ۱ میلی‌متر به عنوان جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (De Castro et al., 2000). شمارش بذور جوانه‌زده تا روز دوازدهم و نیز سنجش مقدار رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید، طول و وزن خشک اندام‌های هوایی و زیرزمینی و مقدار پرولین، در روز دوازدهم جوانه‌زنی صورت گرفت.

#### شرایط و مراحل پرایمینگ بذور: در پژوهش

حاضر، پرایمینگ با محلول‌های  $KNO_3$  (۰/۹ درصد) و  $Na_2SiO_3$  (۱/۵ میلی مولار) در چهار مدت زمانی ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت، در دمای اتاقک رشد انجام گرفت. غلظت‌های استفاده شده از بررسی برخی منابع با مقداری تغییر به کار برده شدند (Ahmadvand et al.,

منظور بهبود وضعیت کشت بذر یونجه در مزرعه، پیش از کشت، از کودهای شیمیایی پتاسیمی و فسفوری، برخی از عناصر ریزمغذی و همین‌طور از تی در خاک استفاده گردد (Berg et al., 2005). بنابراین، به نظر رسید با توجه به پیش‌بینی تأثیر مفید این عناصر در کمیّت و کیفیت یونجه و نیز به منظور القای تحمل تنش در بذرها، پرایمینگ با تیمارهای  $Na_2SiO_3$  (سدیم متاسیلیکات) و  $KNO_3$  (نیترات پتاسیم) (Batoool et al., 2009؛ Azooz, 2009)؛ 2015؛ Norouzi Haroni et al., 2015) روی بذور پیش از کاشت، اعمال شده و سپس شاخص‌های رشد و جوانه زنی بذور یونجه در دو حالت اعمال تنش شوری (۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) و عدم وجود تنش (آب مقطر) با یکدیگر مقایسه گردند.

#### مواد و روش‌ها

رقم همدانی، یکی از ارقام معروف گونه *Medicago Sativa* یونجه در ایران است که برای کاشت در مناطقی که دارای زمستان‌های سرد و طولانی و تابستان معتدل نظیر همدان هستند، بسیار مناسب است. این رقم، در مناطق مرتفع یا کوهستانی نظیر همدان، به خوبی رشد می‌کند و محصول مناسبی تولید می‌نماید. برخی مناطق معتدل و سرد دیگر نظیر: اراک، شمال خراسان، کردستان و سایر مناطق با آب و هوای مشابه، نیز برای کشت این رقم مناسب هستند (Khodabandeh, 2009).

#### آزمون تعیین غلظت مناسب کلرید سدیم

جهت اعمال تنش شوری: برای تعیین غلظت مناسب شوری و بررسی تأثیر آن بر بذور پرایم شده،

(بذور پرایم نشده) نیز شرایط مشابه مهیا گردید. سپس، همه پتری دیش‌های محتوی بذور با طول دوره روشنایی و تاریکی مطابق با مراحل قبل قرار داده شدند و کاغذهای صافی هر چهار روز یک‌بار تعویض گردید. ارزیابی و شمارش بذور جوانه‌زده در یک دوره ۱۲ روزه انجام شد تا برای ارزیابی پرولین و برخی شاخص‌های رشد، بیومس کافی فراهم آید. در روز دوازدهم، به منظور سنجش میزان رنگیزه‌ها، اندازه‌گیری طول و وزن خشک ساقه‌چه، ریشه‌چه و سنجش مقدار پرولین برداشت بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهچه‌های حاصل (با جداسازی از منطقه یقه)، انجام شد. اندازه‌گیری مقدار کلروفیل‌های *a* و *b* و کاروتنوئید کل با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) و با استفاده از متانول خالص و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6300، شرکت JENWAY، انگلستان) بر حسب میکروگرم رنگدانه بر میلی‌گرم وزن تر برگ، محاسبه گردید. کلروفیل کل از مجموع مقادیر کلروفیل‌های *a* و *b* به دست آمد. برای سنجش میزان پرولین، از گیاهچه کامل استفاده شد و این شاخص با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) بر حسب میکروگرم پرولین بر میلی‌گرم وزن تر بافت اندازه‌گیری گردید. سایر مؤلفه‌ها و شاخص‌ها، بر اساس رابطه‌های ذیل محاسبه و نتایج آن در قالب جدول‌هایی ارائه شد.

(Torabi *et al.*, 2012; 2012). بدین منظور، بذور سالم یونجه همدانی با محلول ویتاواکس ۰/۲ درصد، به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. آنگاه، بذور در پتری دیش‌ها قرار گرفته و میزان ۸ میلی‌لیتر از تیمارهای مزبور به هر یک از پلیت‌ها افزوده شد. در مرحله بعد، پتری دیش‌های محتوی بذور در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتیگراد و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. در پایان ساعات مذکور، تیمارهای پرایمینگ قطع شد و بذرها با دستمال کاغذی نرم و بدون گرک آبیگری شده، برای خشک شدن، به مدت ۴۸ ساعت در دمای فوق‌الذکر قرار گرفتند.

#### اعمال تنش شوری بر بذور پرایم شده: پس از

خشک کردن کامل بذور پرایم شده تا رسیدن به محتوای رطوبت اولیه، تعداد ۴۰ بذور به طور تصادفی درون پتری دیش‌هایی با قطر ۱۰ سانتی‌متر دارای دو قطعه کاغذ صافی (به عنوان بستر و نیز پوشش سطحی بذور) قرار گرفتند و ۸ میلی‌لیتر از محلول کلرید سدیم ۲۰۰ میلی‌مولار به نیمی از پتری دیش‌ها (شرایط تنش) و معادل آن نیز آب دوبار تقطیر به نیم دیگر پتری دیش‌ها (شرایط بدون تنش، آب مقطر) اضافه گردید. برای هر تیمار در سطوح زمانی گفته شده، ۴ پتری دیش در شرایط شوری و ۴ پتری دیش دیگر در شرایط آب مقطر (هر پتری دیش به عنوان یک تکرار) در نظر گرفته شد، برای گروه شاهد

رابطه ۱: درصد جوانه‌زنی نهایی (Final Germination Percentage)، (Kader, 2005).

$$FGP = 100 \times (\text{تعداد کل بذور} / \text{تعداد نهایی بذور جوانه‌زده})$$

رابطه ۲: میانگین زمان جوانه‌زنی (Mean Germination Time)، (Kader, 2005).

$$MGT = \sum f_i \cdot x_i / \sum f_i$$

f<sub>i</sub>: بذور جوانه‌زده در روز x

رابطه ۳: میانگین روزانه جوانه‌زنی (Mean Daily Germination)، (Ranal and Santana, 2006).

تعداد روزهای آزمایش / FGP = MDG

رابطه ۴: ضریب سرعت جوانه‌زنی (Coefficient of Velocity of Germination)، (Jones and Sanders, 1987).

$$CVG = 100 \times (N_1 + N_2 + \dots + N_x) / (N_1 T_1 + \dots + N_x T_x)$$

N: تعداد بذور جوانه‌زده در هر روز؛ T: شماره روز مربوط به تعداد N ام

رابطه ۵: میانگین سرعت جوانه‌زنی، (Mean Germination Rate)، (Labouriau, 1970).

$$MGR = CVG/100$$

n: تعداد بذورهای جوانه‌زده در هر روز / تعداد روزها از آغاز آزمایش

رابطه ۶: شاخص تیمسون (Timson Index)، (Timson, 1965؛ Pujol et al., 2000).

$$TI = \sum G_i / T$$

G<sub>i</sub>: درصد بذور جوانه‌زده در هر روز؛ T: تعداد کل روزهای آزمایش

رابطه ۷: میانگین زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی (T<sub>50</sub>)، (Salehzade et al., 2009).

$$T_{50} = t_i + [(N/2 - n_i)(t_j - t_i)] / (n_j - n_i) N$$

N: تعداد نهایی بذور جوانه‌زده؛ n<sub>i</sub> و n<sub>j</sub>: به ترتیب مجموع بذور جوانه‌زده در زمان‌های t<sub>i</sub> و t<sub>j</sub> به طوری که n<sub>i</sub> < N/2 < n<sub>j</sub>

رابطه ۸: ضریب یکنواختی جوانه‌زنی (Coefficient of Uniformity of Germination)، (Ranal and Santana, 2006).

$$CUG = \sum_{i=1}^k n_i / \sum_{i=1}^k (D - D_i)^2 n_i, D = CVG/100$$

n<sub>i</sub>: تعداد بذور جوانه‌زده در هر روز؛ D<sub>i</sub>: تعداد روزها از شروع کاشت

رابطه ۹: تعیین ضریب آلومتری (Coefficient of Allometry)، (Shams-Esfandabadi et al., 2005).

$$CA = L_s / L_r$$

L<sub>s</sub>: طول ساقه؛ L<sub>r</sub>: طول ریشه

رابطه ۱۰: شاخص بنیه یک (شاخص طولی جوانه‌زنی) (Vigor Index (I))، (Abbasian and Moemeni, 2013).

Vigour Index (I) = درصد جوانه‌زنی × (ارتفاع ساقه‌چه + ارتفاع ریشه‌چه)

رابطه ۱۱: شاخص بنیه دو (شاخص وزنی جوانه‌زنی) (Vigor Index (II))، (Abbasian and Moemeni, 2013).

Vigour Index (II) = درصد جوانه‌زنی × (وزن خشک ساقه‌چه + وزن خشک ریشه‌چه)

تکرار انجام گرفت و هر پتری دیش حاوی ۴۰ عدد بذور به عنوان یک تکرار لحاظ شد. محاسبه و دسته‌بندی داده‌های آزمون با نرم‌افزار Excel انجام شد. سپس نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹، تحت آنالیز واریانس ANOVA و مقایسه میانگین چند دامنه دانکن قرار گرفته و داده‌ها به صورت جدول ارائه شد.

طراحی آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارها شامل پرایمینگ: Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> و KNO<sub>3</sub> و مدت زمان شامل صفر (شاهد یا بدون پرایمینگ)، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت و اعمال تنش شوری به صورت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (شرایط تنش) و شرایط بدون تنش (یا آب مقطر) بودند که هر یک از ترکیب‌های تیماری ذکر شده در چهار

## نتایج

### تعیین غلظت مناسب شوری جهت اعمال تنش:

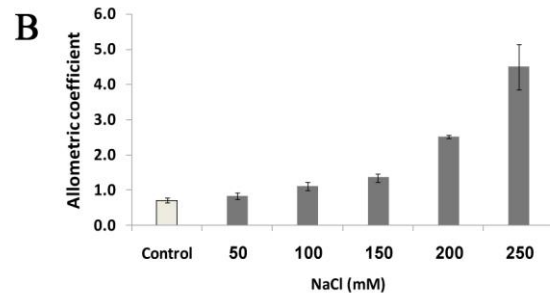
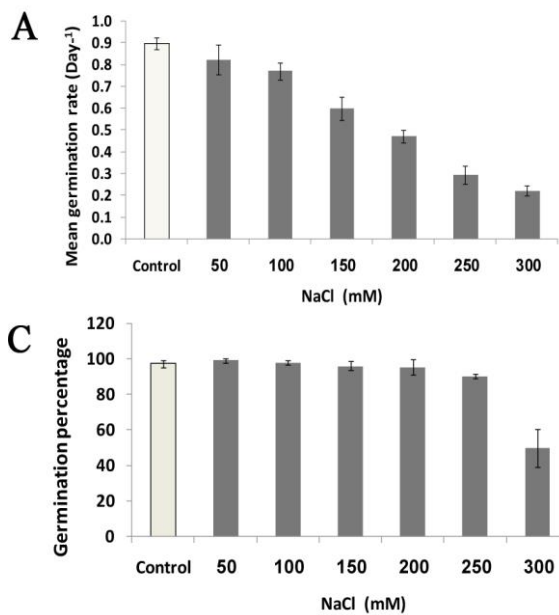
شکل ۱-۱-A نشان می‌دهد که میانگین سرعت جوانه‌زنی بذور، با افزایش غلظت نمک کلرید سدیم به صورت تدریجی کاهش یافته، ضریب آلومتری یا نسبت طول ساقه چه به ریشه چه (شکل ۱-۱-B)، افزایش می‌یابد، که این موضوع به علت کاهش شدیدتر طول ریشه چه نسبت به ساقه چه است. شکل ۱-۱-C نشان می‌دهد که از غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به بعد، درصد جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. غلظت‌های ۲۰۰ میلی مولار و بالاتر در محدوده شوری‌های زیاد قرار دارد و در مطالعه حاضر، این غلظت به عنوان غلظت مورد نظر برای اعمال تنش شوری در نظر گرفته شد.

### بررسی تأثیر تیمارهای پرایمینگ بر صفات

**بررسی شده:** بررسی داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که تنش شوری سبب افت قابل ملاحظه درصد جوانه‌زنی در بذور شاهد شده است. در حالی که برخی تیمارها نظیر تیمار ۳ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و ۳، ۶ و ۹ ساعته  $\text{KNO}_3$ ، سبب بهبود و افزایش درصد جوانه‌زنی بذور (FGP) در شرایط تنش، در مقایسه با وضعیت شاهد در تنش (۲۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم) شده است، گرچه درصد جوانه‌زنی آنها به مقدار آن در شاهد بدون تنش (آب مقطر) نرسید. تیمارهای ۱۲ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$ ، هر دو باعث بدتر شدن وضعیت و کاهش درصد جوانه‌زنی بذور در شرایط تنش حتی در مقایسه با شاهد در تنش، شدند. درصد جوانه‌زنی کلیه بذور پرایم شده‌ای که در شرایط بدون تنش (آب مقطر) قرار گرفتند، مشابه وضعیت شاهد در آب بود. مقایسه نمونه‌های شاهد با یکدیگر نشان می‌دهد که

میانگین زمان جوانه‌زنی (MGT) بر اثر تنش شوری، تقریباً به میزان ۳/۵ برابر افزایش یافته است که نشان‌دهنده تأخیر در جوانه‌زنی بذور یا به بیان دیگر، کاهش سرعت جوانه‌زنی بذور بر اثر اعمال کلرید سدیم در محیط کشت است. بذور پرایم شده با  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ۶ ساعته و کلیه سطوح زمانی تیمار  $\text{KNO}_3$  هنگامی که بذور در تنش قرار گرفتند، بهبود وضعیت نسبت به شاهد در تنش را نشان دادند، اما مقدار عددی این شاخص در آنها به شاهد در آب نرسید. تیمار  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ۱۲ ساعته، شرایط را حتی نسبت به شاهد در تنش بدتر نمود و سبب افزایش این شاخص به ۴/۰۷ روز در شرایط تنش گردید (جدول ۱).

تیمارهای ۹ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$  در شرایط بدون تنش شوری یا آب، موجب ارتقای بسیار خوب وضعیت متوسط جوانه‌زنی روزانه (MDG) حتی نسبت به شاهد در آب شدند، در حالی که همین تیمارها در شرایط تنش، تغییری در وضعیت بذور ایجاد نکردند (جدول ۱). این موضوع نشان‌دهنده بهبود وضعیت شاخص میانگین جوانه‌زنی بذور در روز را بر اثر اعمال پرایمینگ در شرایط بدون تنش است، گرچه تیمارهای پرایمینگ، در شرایط تنش، قادر به افزایش تعداد میانگین جوانه‌زنی در روز نبودند. ضریب سرعت جوانه‌زنی (CVG) که افزایش آن نشان‌دهنده افزایش میزان سرعت جوانه‌زنی بذور است، بر اثر تنش شوری کاهش یافت. تیمار ۶ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و تیمارهای ۳، ۶ و ۹ ساعته  $\text{KNO}_3$ ، موجب بهبود وضعیت در شرایط تنش نسبت به شاهد شدند. اغلب تیمارها در شرایط بدون تنش، وضعیتی مشابه شاهد در آب را نشان دادند (جدول ۱).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف شوری (میلی مولار) نمک کلرید سدیم بر شاخص‌های (A: میانگین سرعت جوانه‌زنی، B) ضریب آلومتری بذور یونجه و (C) درصد جوانه‌زنی نهایی بذور یونجه (*Medicago sativa*) رقم همدانی در یک آزمون ۱۲ روزه. مقادیر، میانگین چهار تکرار  $\pm$  StD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر نوع تیمار و سطوح مختلف زمان پرایمینگ بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذور یونجه (*Medicago sativa*). مقادیر، میانگین چهار تکرار  $\pm$  StD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است. FGP: درصد جوانه‌زنی نهایی، MGT: میانگین زمان جوانه‌زنی، MDG: میانگین روزانه جوانه‌زنی، CVG: ضریب سرعت جوانه‌زنی، MGR: میانگین سرعت جوانه‌زنی، CA: ضریب آلومتری.

تیمار	زمان (ساعت)	FGP (درصد)	MGT (روز)	MDG (درصد بذور در روز)	CVG	MGR (در روز)	CA
شاهد در تنش (بدون پرایم)	۰	۷۰/۲ <sup>d</sup>	۳/۴۷ <sup>ab</sup>	۱۱/۰۰ <sup>e</sup>	۲۹/۴ <sup>fg</sup>	۰/۲۹ <sup>i</sup>	۲/۰۷ <sup>b</sup>
	۰	۹۹/۴ <sup>a</sup>	۱/۰۵ <sup>e</sup>	۳۹/۶ <sup>cd</sup>	۹۵/۱ <sup>ab</sup>	۰/۹۵ <sup>a-d</sup>	۰/۷۰ <sup>c</sup>
اعمال تنش شوری، به بذور پرایم شده با Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	۳	۷۹/۱ <sup>c</sup>	۳/۰۱ <sup>b-d</sup>	۹/۱۷ <sup>e</sup>	۳۳/۳ <sup>e-g</sup>	۰/۳۳ <sup>g-i</sup>	۱/۹۴ <sup>b</sup>
	۶	۶۷/۵ <sup>d</sup>	۲/۶۲ <sup>d</sup>	۷/۸۹ <sup>e</sup>	۳۸/۰ <sup>e</sup>	۰/۳۸ <sup>gh</sup>	۲/۱۲ <sup>b</sup>
	۹	۶۶/۶ <sup>d</sup>	۳/۳۷ <sup>bc</sup>	۷/۳۷ <sup>e</sup>	۳۱/۱ <sup>fg</sup>	۰/۳۱ <sup>hi</sup>	۲/۱۰ <sup>b</sup>
	۱۲	۴۳/۷ <sup>f</sup>	۴/۰۷ <sup>a</sup>	۴/۴۴ <sup>e</sup>	۲۶/۴ <sup>g</sup>	۰/۲۶ <sup>i</sup>	۲/۳۸ <sup>ab</sup>
بدون تنش شوری (در آب مقطر)، پرایم شده با Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	۳	۹۹/۳ <sup>a</sup>	۱/۱۳ <sup>e</sup>	۳۰/۴۹ <sup>d</sup>	۸۸/۷ <sup>bc</sup>	۰/۸۹ <sup>c-e</sup>	۰/۹۳ <sup>c</sup>
	۶	۹۹/۳ <sup>a</sup>	۱/۰۴ <sup>e</sup>	۴۹/۵ <sup>c</sup>	۹۶/۴ <sup>ab</sup>	۰/۹۶ <sup>a-c</sup>	۰/۸۹ <sup>c</sup>
	۹	۹۹/۳ <sup>a</sup>	۱/۰۶ <sup>e</sup>	۸۲/۹ <sup>b</sup>	۹۴/۶ <sup>a-c</sup>	۰/۹۸ <sup>ab</sup>	۰/۹۴ <sup>c</sup>
	۱۲	۱۰۰/۰ <sup>a</sup>	۱/۲۶ <sup>e</sup>	۵۰/۰ <sup>c</sup>	۸۴/۶ <sup>c</sup>	۰/۸۵ <sup>e</sup>	۰/۷۶ <sup>c</sup>
اعمال تنش شوری، به بذور اسموپرایم شده با KNO <sub>3</sub>	۳	۸۵/۶ <sup>b</sup>	۲/۵۰ <sup>d</sup>	۱۰/۹۵ <sup>e</sup>	۵۰/۷ <sup>d</sup>	۰/۵۱ <sup>f</sup>	۲/۳۹ <sup>ab</sup>
	۶	۸۰/۶ <sup>b</sup>	۲/۴۰ <sup>d</sup>	۱۱/۲۳ <sup>e</sup>	۳۸/۶ <sup>e</sup>	۰/۳۹ <sup>gh</sup>	۲/۳۳ <sup>b</sup>
	۹	۷۸/۷ <sup>c</sup>	۲/۳۳ <sup>d</sup>	۹/۰۳ <sup>e</sup>	۴۵/۳ <sup>de</sup>	۰/۵۰ <sup>f</sup>	۲/۰۹ <sup>b</sup>
	۱۲	۵۳/۳ <sup>e</sup>	۲/۷۲ <sup>cd</sup>	۶/۵۰ <sup>e</sup>	۳۱/۸ <sup>fg</sup>	۰/۴۱ <sup>g</sup>	۲/۹۶ <sup>a</sup>
بدون تنش شوری (در آب مقطر)، اسموپرایم شده با KNO <sub>3</sub>	۳	۱۰۰/۰ <sup>a</sup>	۱/۱ <sup>e</sup>	۳۹/۵ <sup>cd</sup>	۹۰/۶ <sup>c</sup>	۰/۹۱ <sup>b-e</sup>	۱/۳ <sup>c</sup>
	۶	۹۸/۱ <sup>a</sup>	۱/۰۳ <sup>e</sup>	۴۹/۱ <sup>c</sup>	۹۷/۵ <sup>ab</sup>	۰/۹۸ <sup>ab</sup>	۱/۰۴ <sup>c</sup>
	۹	۹۹/۳ <sup>a</sup>	۱/۰۱ <sup>e</sup>	۹۹/۷ <sup>a</sup>	۹۹/۳ <sup>a</sup>	۰/۹۹ <sup>a</sup>	۱/۳۴ <sup>c</sup>
	۱۲	۱۰۰/۰ <sup>a</sup>	۱/۱۴ <sup>e</sup>	۵۰/۰ <sup>c</sup>	۸۸/۰ <sup>bc</sup>	۰/۸۸ <sup>de</sup>	۱/۰۳ <sup>c</sup>

(جدول ۱).

تیمار ۳ ساعته  $\text{KNO}_3$  موجب بهبود شاخص ویگور یک (Vig I) در تنش گردید، اما تیمارهای ۱۲ ساعته  $\text{KNO}_3$  و  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ، سبب افت شاخص و بدتر شدن وضعیت، حتی نسبت به شاهد در تنش شدند (جدول ۲).

در نمونه‌های پرایم نشده، وزن خشک ساقه تحت تأثیر تنش شوری تغییر نکرد، اما وزن خشک ریشه‌چه کاهش یافت. تیمارهای  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و تیمارهای ۹ و ۱۲ ساعته  $\text{KNO}_3$  نیز سبب کاهش وزن خشک ساقه چه در تنش شدند.

تیمار ۶ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و کلیه سطوح زمانی  $\text{KNO}_3$  موجب افزایش میانگین سرعت جوانه‌زنی (MGR)، و بهبود وضعیت بذور در تنش، نسبت به شاهد در تنش شدند، اما قادر به افزایش جوانه زنی به میزان شاهد در آب نبودند. تیمارهای پرایمینگ در شرایط تنش، سبب تغییری در ضریب آلومتری (CA)، نسبت به شاهد در تنش نشدند. زیرا در کلیه موارد، رشد ساقه چه و ریشه چه بر اثر نمک، به یک میزان کاهش یافت. تنها در تیمار ۱۲ ساعته  $\text{KNO}_3$ ، به دلیل کاهش شدیدتر طول ریشه چه نسبت به ساقه چه، افزایش ضریب آلومتری مقداری بیش از شاهد در تنش مشاهده گردید.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع تیمار و سطوح مختلف زمان پرایمینگ بر شاخص‌های رشد، جوانه‌زنی و مقدار پرولین در بذور یونجه (*Medicago sativa*). مقادیر، میانگین چهار تکرار  $\pm$  StD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است.

تیمار	زمان (ساعت)	شاخص ویگور یک	وزن خشک ساقه (میلی‌گرم)	وزن خشک ریشه (میلی‌گرم)	شاخص ویگور دو	شاخص تیمسون	زمان رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی (روز)	ضریب یکنواختی جوانه‌زنی	پرولین (میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر)
شاهد در تنش (بدون پرایم)	۰	۱۲۲ <sup>gh</sup>	۱/۶۴ <sup>ab</sup>	۰/۲۵ <sup>c-f</sup>	۱۳۰ <sup>bc</sup>	۱۱/۲ <sup>d</sup>	۲/۹۶ <sup>d</sup>	۰/۴۳ <sup>f</sup>	۵۲ <sup>a</sup>
	۰	۴۷۹ <sup>a</sup>	۱/۶۱ <sup>ab</sup>	۰/۵۹ <sup>a</sup>	۲۱۸ <sup>a</sup>	۳۹/۶ <sup>bc</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۲۶/۲ <sup>bc</sup>	۷ <sup>d</sup>
اعمال تنش شوری، به بذور پرایم شده با $\text{Na}_2\text{SiO}_3$	۳	۱۴۲ <sup>fg</sup>	۱/۰۶ <sup>d</sup>	۰/۲۴ <sup>d-f</sup>	۱۰۲ <sup>cd</sup>	۹/۱ <sup>d</sup>	۱/۷۸ <sup>cd</sup>	۰/۲۹ <sup>f</sup>	۲/۲ <sup>d</sup>
	۶	۱۰۷ <sup>g-i</sup>	۱/۱۷ <sup>b-d</sup>	۰/۱۹ <sup>ef</sup>	۹۱/۳ <sup>cd</sup>	۷/۹ <sup>d</sup>	۱/۶ <sup>cd</sup>	۰/۳۳ <sup>f</sup>	۳/۶ <sup>d</sup>
	۹	۸۸/۱ <sup>hi</sup>	۱/۱۴ <sup>cd</sup>	۰/۲۰ <sup>ef</sup>	۹۰/۷ <sup>cd</sup>	۶/۶ <sup>d</sup>	۱/۹۸ <sup>bc</sup>	۰/۲۸ <sup>f</sup>	۵/۸ <sup>d</sup>
	۱۲	۶۳/۷ <sup>i</sup>	۱/۰۹ <sup>d</sup>	۰/۳۶ <sup>b-c</sup>	۷۱/۶ <sup>bc</sup>	۴/۴ <sup>d</sup>	۲/۴۴ <sup>ab</sup>	۰/۱۵ <sup>f</sup>	۲/۶ <sup>d</sup>
بدون تنش شوری (در آب مقطر)، پرایم شده با $\text{Na}_2\text{SiO}_3$	۳	۴۵۰ <sup>a-d</sup>	۱/۵۸ <sup>b-c</sup>	۰/۳۴ <sup>b-e</sup>	۱۹۰ <sup>a</sup>	۳۰/۴ <sup>c</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۲۱/۴ <sup>c</sup>	۲/۹ <sup>d</sup>
	۶	۴۳۴ <sup>a-e</sup>	۱/۶۱ <sup>ab</sup>	۰/۴۱ <sup>bc</sup>	۲۰۱ <sup>a</sup>	۴۹/۵ <sup>b</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۲۵/۳ <sup>bc</sup>	۳/۲ <sup>d</sup>
	۹	۴۰۹ <sup>c-e</sup>	۱/۶۳ <sup>ab</sup>	۰/۳۹ <sup>b-d</sup>	۲۰۰ <sup>a</sup>	۸۲/۹ <sup>a</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۱۸/۴ <sup>cd</sup>	۲/۳ <sup>d</sup>
	۱۲	۴۷۶ <sup>ab</sup>	۱/۵۵ <sup>b-c</sup>	۰/۴۴ <sup>ab</sup>	۱۹۹ <sup>a</sup>	۴۳/۷ <sup>bc</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۵/۸۱ <sup>ef</sup>	۲/۵ <sup>d</sup>
اعمال تنش شوری، به بذور اسموپرایم شده با $\text{KNO}_3$	۳	۱۷۵ <sup>f</sup>	۱/۹۴ <sup>a</sup>	۰/۲۸ <sup>b-f</sup>	۱۹۵ <sup>a</sup>	۱۰/۹ <sup>d</sup>	۱/۳ <sup>cd</sup>	۰/۳۵ <sup>f</sup>	۱۶ <sup>c</sup>
	۶	۱۴۴ <sup>fg</sup>	۱/۵۷ <sup>b-c</sup>	۰/۲۳ <sup>d-f</sup>	۱۴۷ <sup>b</sup>	۱۴/۰ <sup>d</sup>	۱/۰۵ <sup>c</sup>	۰/۳۵ <sup>f</sup>	۲۰ <sup>c</sup>
	۹	۱۳۲ <sup>f-h</sup>	۱/۱۳ <sup>cd</sup>	۰/۲۷ <sup>b-f</sup>	۱۱۱ <sup>bcd</sup>	۹/۰ <sup>d</sup>	۰/۹۳ <sup>c</sup>	۰/۳۲ <sup>f</sup>	۱۷ <sup>c</sup>
	۱۲	۶۶/۷ <sup>i</sup>	۰/۷۳ <sup>d</sup>	۰/۱۱ <sup>f</sup>	۴۴/۹ <sup>c</sup>	۸/۴ <sup>d</sup>	۱/۵ <sup>c-c</sup>	۰/۲۶ <sup>f</sup>	۲۷ <sup>b</sup>
بدون تنش شوری (در آب مقطر)، اسموپرایم شده با $\text{KNO}_3$	۳	۳۹۴/۵ <sup>de</sup>	۱/۷۵ <sup>a</sup>	۰/۳۹ <sup>b-d</sup>	۲۱۳ <sup>a</sup>	۳۹/۵ <sup>bc</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۱۱/۳ <sup>de</sup>	۵ <sup>d</sup>
	۶	۴۲۴ <sup>b-e</sup>	۲/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۴۳ <sup>bc</sup>	۲۱۳ <sup>a</sup>	۴۹/۱ <sup>b</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۳۲/۰ <sup>ab</sup>	۴ <sup>d</sup>
	۹	۳۷۲ <sup>c</sup>	۱/۷۸ <sup>a</sup>	۰/۳۴ <sup>b-e</sup>	۲۱۰ <sup>a</sup>	۸۷/۱ <sup>a</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۳۶/۳ <sup>a</sup>	۶ <sup>d</sup>
	۱۲	۴۱۸ <sup>c-c</sup>	۱/۸۴ <sup>a</sup>	۰/۳۵ <sup>b-e</sup>	۲۱۸ <sup>a</sup>	۵۰/۰ <sup>b</sup>	۰/۰۱ <sup>f</sup>	۹/۷ <sup>de-f</sup>	۶ <sup>d</sup>

شدن و کاهش بدسبزی (عدم ظهور یکسان و همزمان گیاهچه‌ها) بذور است.

بنابراین به طور کلی، شاخص‌های MGT، FGP، CVG، MGR و T50 در بیشتر حالت‌ها نشان‌دهنده برتری تیمارهای  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ۳ و ۶ ساعته و نیز کلیه ترکیب‌های زمانی تیمار  $\text{KNO}_3$  در شرایط تنش بود و در شرایط فقدان تنش، در بیشتر حالت‌ها، وضعیت مشابه نمونه شاهد در آب بود اما برتری ترکیب‌های تیماری در زمان‌های ۶ و ۹ ساعت با هر دو ماده نیز در این شرایط مشاهده شد.

با مقایسه شاهد در آب و شاهد در تنش، تفاوت قابل ملاحظه و بیش از ۷ برابری مقدار پرولین در شاهد تنش شوری، نسبت به شاهد در آب، ملاحظه گردید. کلیه سطوح زمانی تیمار  $\text{KNO}_3$  موجب افزایش مقدار پرولین در بذور در تنش اما تا کمتر از مقدار شاهد در تنش گردیدند، سایر تیمارها تغییری نداشتند. افزایش مقدار پرولین در تیمار ۱۲ ساعته  $\text{KNO}_3$  در تنش، از سه سطح زمانی دیگر بیشتر بود و به نظر می‌رسد، این مورد که در اغلب شاخص‌ها نیز وضعیت مناسبی نداشته، بهبود وضعیت بذور در آن ملاحظه نمی‌شود، ممکن است نشان‌دهنده شدت مقابله با تنش باشد. تیمار  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در هیچ یک از نمونه‌ها از جمله تیمار ۱۲ ساعته سبب افزایش مقدار پرولین نشد (جدول ۲). مقدار کلروفیل a (Chl a) در شاهد در تنش کاهش یافت و به حدود یک سوم مقدار آن در شاهد در آب رسید. اغلب تیمارهای  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و کلیه تیمارهای  $\text{KNO}_3$ ، مقدار کلروفیل گیاهچه در تنش را به میزان شاهد در آب افزایش دادند. وضعیت کلیه تیمارها در آب نیز مشابه شاهد در آب بود، به غیر از آن که تیمار

در ارتباط با ریشه چه، تیمارهای پرایمینگ سبب کاهش وزن خشک ریشه‌چه در شرایط بدون تنش (آب مقطر) شدند اما مقادیر، از مقدار وزن خشک ریشه‌چه در شرایط تنش بیشتر بودند (جدول ۲). شاخص ویگور دو (Vig II) که با مجموع مقادیر وزن خشک ساقه چه و ریشه چه مرتبط است، نیز در اثر تنش شوری کاهش یافت، اما بر اثر تیمار ۳ ساعته  $\text{KNO}_3$  به مقدار آن در شاهد در آب رسید. پرایمینگ‌های ۱۲ ساعته هر دو تیمار، این شاخص را به مقداری پایین‌تر از شاهد در تنش رساند. نمونه‌های تیمار شده در آب، شرایطی مشابه شاهد در آب داشتند (جدول ۲). تیمار ۹ ساعته با  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$ ، شاخص تیمسون (TI) که بالا بودن آن نشان‌دهنده سرعت بیشتر جوانه زنی بذور است را در شرایط بدون تنش، به مقداری خیلی بیشتر از شاهد در آب افزایش داد (جدول ۲). تیمارهای سطوح زمانی ۳، ۶ و ۹ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و تمامی سطوح زمانی  $\text{KNO}_3$ ، سبب کاهش زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد کل جوانه زنی (T50) و بهبود شرایط شد اما به اندازه شاهد در آب نرسید. کاهش زمان رسیدن به ۵۰ درصد کل جوانه زنی، می‌تواند در کاهش فاصله جوانه زدن بذور و بنابراین بهبود وضعیت سبز شدن دارای اهمیت باشد. ضمن این که بذور پرایم شده در آب دارای شرایطی مشابه شاهد خود بودند (جدول ۲). دو تیمار ۶ و ۹ ساعته  $\text{KNO}_3$  سبب بهبود و افزایش ضریب یکنواختی جوانه زنی (CUG) بذور در شرایط آب شدند. اما تیمار ۱۲ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  باعث بدتر شدن وضعیت و کاهش ضریب یکنواختی تا حد شاهد در تنش، برای بذور در شرایط آب شد (جدول ۲). افزایش این ضریب نشان‌دهنده یکنواختی بیشتر در سبز



$\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در شرایط تنش افزایش یافت. نسبت کاروتنوئید به کلروفیل نیز به دلیل افزایش مقدار کلروفیل در بیشتر حالت‌ها کاهش یافت (جدول ۳). بنابراین، به طور کلی، تنش شوری سبب کاهش مقدار کلروفیل‌های a و b و کلروفیل کل شد و مقدار کاروتنوئید کل را نیز کاهش داد، اما پرایمینگ با  $\text{KNO}_3$  و  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  تقریباً در تمامی حالت‌ها، سبب افزایش مقدار کلروفیل‌ها در گیاهچه در حالت تنش شد، در حالی که نسبت کلروفیل‌ها و مقدار کاروتنوئید را تحت تأثیر قرار نداد. در عین حال، در برخی موارد نیز تأثیر تیمارها (به طور عمده در شرایط آب) موجب بهبود شاخص‌ها به وضعیتی بهتر از شاهد در آب گردید.

۱۲ ساعته  $\text{KNO}_3$ ، مقدار کلروفیل a گیاهچه در شرایط بدون تنش را به میزان بیشتری افزایش داد و به ۱/۵ برابر مقدار آن در شاهد در آب رسانید (جدول ۳). کلروفیل b (Chl b) نیز در اثر تنش کاهش یافت، اما اغلب تیمارها سبب افزایش مقدار آن در شرایط تنش شدند (جدول ۳). به علت تغییرات تقریباً هماهنگ هر دو کلروفیل در بیشتر حالت‌های تنش و غیرتنش، نسبت کلروفیل a به b تغییر چندانی نداشت، گرچه در تیمار با  $\text{KNO}_3$  مقداری افزایش مشاهده شد (جدول ۳). اغلب تیمارها در تنش، سبب افزایش مقدار کلروفیل کل (T Chl) به میزان شاهد در آب شدند (جدول ۳). مقدار کاروتنوئید کل تنها بر اثر تیمار ۶ ساعته

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر نوع تیمار و سطوح مختلف زمان پرایمینگ بر رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاهچه یونجه (*Medicago sativa*) بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر. مقادیر، میانگین چهار تکرار  $\pm$  StD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P < 0.05$  است.

تیمار	زمان (ساعت)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a به کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید کل	کاروتنوئید کل به کلروفیل کل
شاهد در تنش (بدون پرایم)	۰	۰/۱۲ <sup>h</sup>	۰/۱۵ <sup>h</sup>	۰/۷۹ <sup>d</sup>	۰/۲۷ <sup>g</sup>	۰/۰۷ <sup>b-c</sup>	۰/۲۶ <sup>b</sup>
	۰	۰/۴۴ <sup>b-d</sup>	۰/۴۳ <sup>b-f</sup>	۱/۰۱ <sup>b-d</sup>	۰/۸۷ <sup>a-e</sup>	۰/۰۸ <sup>b-e</sup>	۰/۰۹ <sup>c</sup>
اعمال تنش شوری، به بذور پرایم شده با $\text{Na}_2\text{SiO}_3$	۳	۰/۴۴ <sup>b-d</sup>	۰/۴۹ <sup>a-e</sup>	۰/۸۸ <sup>d</sup>	۰/۹۳ <sup>a-e</sup>	۰/۰۲ <sup>f</sup>	۰/۰۲ <sup>c</sup>
	۶	۰/۲۸ <sup>e-g</sup>	۰/۳۵ <sup>e-g</sup>	۰/۸۴ <sup>d</sup>	۰/۶۳ <sup>ef</sup>	۰/۲۷ <sup>a</sup>	۰/۰۴ <sup>a</sup>
	۹	۰/۲۶ <sup>f-h</sup>	۰/۲۷ <sup>f-h</sup>	۱/۰۴ <sup>a-d</sup>	۰/۵۳ <sup>fg</sup>	۰/۰۲ <sup>f</sup>	۰/۰۳ <sup>c</sup>
	۱۲	۰/۳۴ <sup>d-f</sup>	۰/۵۰ <sup>a-d</sup>	۰/۷۶ <sup>d</sup>	۰/۸۴ <sup>b-f</sup>	۰/۰۳ <sup>ef</sup>	۰/۰۲ <sup>c</sup>
بدون تنش شوری (در آب مقطر)، پرایم شده با $\text{Na}_2\text{SiO}_3$	۳	۰/۱۵ <sup>gh</sup>	۰/۱۷ <sup>gh</sup>	0/۸۸ <sup>d</sup>	۰/۳۱ <sup>g</sup>	۰/۰۲ <sup>f</sup>	۰/۰۵ <sup>c</sup>
	۶	۰/۴۹ <sup>a-d</sup>	۰/۵۳ <sup>a-c</sup>	۰/۹۳ <sup>cd</sup>	1/۰۲ <sup>a-d</sup>	۰/۰۵ <sup>d-f</sup>	۰/۰۵ <sup>c</sup>
	۹	۰/۵۲ <sup>a-d</sup>	۰/۵۸ <sup>ab</sup>	۰/۸۸ <sup>d</sup>	۱/۱۰ <sup>a-c</sup>	۰/۰۵ <sup>d-f</sup>	۰/۰۵ <sup>c</sup>
	۱۲	۰/۵۶ <sup>ab</sup>	۰/۶۵ <sup>a</sup>	0/۸۷ <sup>d</sup>	۱/۲۱ <sup>a</sup>	۰/۰۵ <sup>d-f</sup>	۰/۰۴ <sup>c</sup>
اعمال تنش شوری، به بذور اسموپرایم شده با $\text{KNO}_3$	۳	۰/۳۸ <sup>c-f</sup>	۰/۲۹ <sup>e-h</sup>	1/۲۶ <sup>ab</sup>	0/۶۷ <sup>d-f</sup>	۰/۰۸ <sup>b-d</sup>	۰/۱۲ <sup>c</sup>
	۶	۰/۴۸ <sup>a-d</sup>	۰/۴۰ <sup>b-f</sup>	1/۲۳ <sup>a-c</sup>	۰/۸۷ <sup>a-e</sup>	۰/۰۷ <sup>b-e</sup>	۰/۰۹ <sup>c</sup>
	۹	۰/۴۴ <sup>b-d</sup>	۰/۳۴ <sup>e-g</sup>	۱/۳۲ <sup>ab</sup>	۰/۷۸ <sup>b-f</sup>	۰/۰۴ <sup>d-f</sup>	۰/۰۶ <sup>c</sup>
	۱۲	۰/۴۸ <sup>a-d</sup>	۰/۳۸ <sup>c-f</sup>	۰/۸۸ <sup>d</sup>	۰/۸۷ <sup>a-f</sup>	۰/۰۶ <sup>c-f</sup>	۰/۰۷ <sup>c</sup>
بدون تنش شوری (در آب مقطر)، اسموپرایم شده با $\text{KNO}_3$	۳	۰/۴۴ <sup>b-d</sup>	۰/۳۷ <sup>c-f</sup>	1/۲۸ <sup>ab</sup>	۰/۸۱ <sup>b-f</sup>	۰/۰۵ <sup>c-f</sup>	۰/۰۹ <sup>c</sup>
	۶	۰/۴۳ <sup>b-e</sup>	۰/۳۲ <sup>d-h</sup>	۱/۳۴ <sup>a</sup>	۰/۷۵ <sup>c-f</sup>	۰/۱۱ <sup>b</sup>	۰/۱۴ <sup>c</sup>
	۹	۰/۵۲ <sup>a-c</sup>	۰/۴۱ <sup>b-f</sup>	۱/۲۷ <sup>ab</sup>	۰/۹۲ <sup>a-e</sup>	۰/۰۷ <sup>b-e</sup>	۰/۰۷ <sup>c</sup>
	۱۲	۰/۶۲ <sup>a</sup>	۰/۴۸ <sup>a-e</sup>	۱/۳۰ <sup>ab</sup>	۱/۱ <sup>ab</sup>	۰/۰۱ <sup>bc</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>

## بحث

گیاه یونجه با آستانه تحمل حدود ۲۰ و حداکثر تحمل ۱۶۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم، یک گیاه نسبتاً حساس به شوری شناخته می‌شود (Shannon, 1984)، اما بررسی میزان تحمل آن می‌بایست در سه مرحله رشدی یعنی جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و رشد مجدد گیاه بالغ پس از برداشت، بررسی شود (Smith, 1984)، زیرا تحمل گیاه به شوری با افزایش رشد و توسعه آن، افزایش می‌یابد (Darvishi et al., 2005). از سویی، مرحله جوانه‌زنی یونجه نیز نخستین و حساس‌ترین مرحله نسبت به تنش شوری است (Dobrenz et al., 1986).

بر اساس منابع، غلظت‌های نمکی محدوده ۱۵۰ میلی مولار و بالاتر، در گروه بسیار شور (highly saline) دسته‌بندی می‌شوند (Pitman and Läuchli, 2002) نقل از Hasanuzzaman و همکاران (۲۰۱۳). در آزمون اعمال غلظت‌های مختلف نمک، درصد جوانه‌زنی بذور یونجه رقم همدانی از غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک به بعد، کاهش یافت. بنابراین غلظت ۲۰۰ میلی مولار به عنوان یک غلظت نمکی بالا که بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بذور اثر منفی دارد اما سبب مرگ گیاهچه نیز نمی‌گردد و از سوی دیگر، تلاش در جهت بهبود رویش بذور برای رشد در خاک‌های دارای این محدوده نمکی نیز منطقی‌تر و محتمل‌تر به نظر می‌رسد، برای اعمال تنش شوری انتخاب گردید. در محیط طبیعی نیز امکان رشد و استقرار یونجه در زمین‌های با شوری بیشتر از ۲۰۰ میلی مولار بسیار پایین است. نتایج حاصل از یک مطالعه در ارزیابی درصد جوانه‌زنی بذور یونجه رقم همدانی در غلظت‌های مختلف نمک، به معرفی

غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار به عنوان غلظت‌های مؤثر در کاهش شدید درصد جوانه‌زنی منجر گردید (Amooaghaei, 2011). بنابراین، کاهش درصد جوانه‌زنی از شوری ۲۰۰ میلی مولار به بعد، ممکن است بتواند در تعیین حساسیت و تحمل بذور به تنش شوری نیز مورد توجه قرار گیرد.

Soltani و همکاران (۲۰۱۲) غلظت بحرانی حساسیت به شوری در اندام‌های هوایی را از روی تأثیر بر تعداد برگ در بوته، طول ساقه، طول گیاه، وزن تر و خشک، (در برخی از ارقام یونجه نظیر همدانی، قره‌یونجه، رهنانی، نیکشهری و یزدی)، ۱۵۰ و برای شاخص طول ریشه، غلظت ۳۰۰ میلی مولار معرفی نمودند. در مطالعه حاضر، طول ساقه گیاهچه (۱۲ روزه) در غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی مولار، و نیز طول ریشه‌چه و کلیه وزن‌های تر و خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه از غلظت ۵۰ میلی مولار به بعد کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد (فاقد نمک) نمایان ساختند (نتایج نشان داده نشده است). همچنین ضریب آلومتری یا نسبت طول ساقه‌چه به ریشه‌چه در این شرایط با افزایش غلظت نمک اعمال شده افزایش یافت که این مورد، به دلیل تفاوت در میزان حساسیت و میزان کاهش رشد ساقه‌چه و ریشه‌چه نسبت به تغییر فشار تورژسانس و سمیت نمک است (Taize and Ziger, 2000). میزان این حساسیت می‌تواند در گیاهان مختلف متفاوت باشد، برای نمونه در یک بررسی، گیاه *Nepeta persica* با افزایش میزان شوری، کاهش شدیدتری را در طول ساقه‌چه در مقایسه با طول ریشه‌چه نشان داد، به طوریکه ضریب آلومتری در آن کاهش یافت (Ali Mohammadizad et al., 2013) در حالی که بررسی دیگر، کاهش شدیدتر طول ریشه‌چه

سلولی و کاهش اندازه مریستم انتهایی ریشه است (West *et al.*, 2004). گزارش‌ها همچنین بیانگر این است که در تنش‌های کوتاه مدت نیز طول ریشه کاهش یافته، اما مشاهده شده است که ظرفیت جذب ریشه برای جبران کاهش سطح جذب در این شرایط افزایش می‌یابد، در حالی که در تنش‌های طولانی مدت نمک، کاهش رشد ریشه و آسیب دیدن سلول‌های آن نیز اتفاق افتاده، در نتیجه مشکلات عدم تعادل مقدار آب در گیاه و سمیت یونی، سبب بروز آسیب و کاهش رشد در اندام‌های هوایی نیز می‌گردد (Wang *et al.*, 2006).

از سوی دیگر، دلایل احتمالی کاهش رشد ریشه می‌تواند به تلاش گیاه برای کاهش دادن منطقه جذب فعال ریشه و به طور کلی سطح قابل جذب فعال ریشه در شرایط تنش نمکی و سمیت یونی و نیز کاهش رشد مناطقی از ریشه بازگردد که به اجبار و به طور مستقیم با تغییرات و نوسانات محیطی در ارتباط هستند.

در نتایج مطالعه حاضر، مشابه پژوهش Ben Ahmed و همکاران (۲۰۰۱) وزن خشک ریشه‌چه نیز بر اثر اعمال تنش شوری بیشتر از ساقه‌چه کاهش یافت. بر اساس نظر پژوهشگران، این مسأله می‌تواند به افزایش و تجمع مقدار  $\text{Na}^+$  و  $\text{Cl}^-$  و کاهش مقدار  $\text{K}^+$  در ریشه‌ها نسبت داده شود. البته برخی مطالعات نیز نشان داده است که بر اثر تنش شوری، وزن خشک ساقه‌چه، بیشتر از ریشه‌چه کاهش یافته است (Rezai *et al.*, 2013). بر اساس نظر Manaa و همکاران (۲۰۱۴)، کاهش وزن خشک کل گیاه می‌تواند به علت افزایش و تجمع مقدار  $\text{Na}^+$  و  $\text{Cl}^-$  و کاهش مقدار  $\text{K}^+$  در ساقه‌ها و اندام‌های هوایی رخ دهد. بنابراین، چه در پاسخ به افزایش میزان شوری و چه در پاسخ به یک غلظت نمکی، گزارش‌های متفاوتی از

یعنی وضعیتی مشابه تحقیق حاضر را نشان داده است (Amoo-Zad-Khalili *et al.*, 2013).

اعمال شوری ۲۰۰ میلی مولار سبب کاهش شدید طول ساقه‌چه و افت شدیدتر طول ریشه‌چه نسبت به شاهد بدون تنش (در آب) گردید. پرایمینگ بذور با  $\text{KNO}_3$  و  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در برخی از سطوح زمانی سبب مقداری افزایش در طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در شرایط تنش گردید، اما از آنجا که این مقادیر را تقریباً به یک میزان افزایش داد، ضریب آلومتری در بذور پرایم شده تفاوت معنی‌داری با شاهد در تنش نشان نداد. بذور پرایم شده در شرایط بدون تنش نیز طول ریشه‌چه و ساقه‌چه کمتری نسبت به شاهد در آب داشتند، اما در این حالت، نسبت ساقه‌چه به ریشه‌چه همچنان ثابت ماند. بر اساس منابع، عوامل منتج به کاهش طول ساقه و ریشه در شرایط تنش، کاهش پتانسیل اسمزی محیط و مقدار آب سلول، تجمع یون‌های سمی نظیر سدیم و کلر، کاهش مقدار فتوسنتز، تولید رادیکال‌های آزاد و نیز کاهش مقدار فسفر دانسته شده (Overlach *et al.*, 1993؛ Munns, 2002؛ Blomster *et al.*, 2011) و مشخص شده است که در مواجهه با تنش نمکی، اغلب رشد ساقه بیشتر از ریشه کاهش می‌یابد (Lauchli and Epstein, 1990) اما برخی گزارش‌ها نیز گویای تأثیرپذیری منفی بیشتری در بخش ریشه‌ها هستند (Ebadi Almas؛ Bar *et al.*, 1997؛ *et al.*, 2013).

به طور کلی، غلظت‌های کمتر نمک، سبب اندکی افزایش طول در ریشه‌ها می‌شود، در حالی که غلظت‌های بیشتر، از رشد طولی ریشه‌ها می‌کاهند (Wang *et al.*, 2009؛ Zolla *et al.*, 2010). بررسی‌ها نشان داده است که کاهش رشد ریشه در واقع نتیجه ممانعت چرخه

آغشتگی اولیه بذر به آب و تأمین زمان بیشتری برای ترمیم آسیب و نظم‌یابی مجدد غشاها، سبب بهبود وضعیت مقدار آب سلول‌ها شده، جوانه زنی و ویگور بذر را افزایش می‌دهد. تأثیر پرایمینگ با سیلیکون در بهبود توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول برای از بین بردن آثار سمیت یونی و افزایش مقاومت به دهیدراتاسیون و بهبود وضعیت آب سلول نیز گزارش شده است (Ahmed *et al.*, 2013). افزون بر این، به طور کلی پرایمینگ بذر سبب پیشبرد مراحل آماده‌سازی بذر برای جوانه‌زنی و نیز طولانی شدن مرحله دوم در الگوی جذب آب توسط بذر می‌شود که در نتیجه آن بسیاری از وقایع مهم نظیر سنتز mRNAها، پروتئین‌ها، افزایش مقدار سطح انرژی سلول، تعمیر DNA و غیره پیشرفت می‌کنند. به بیان دیگر، پرایمینگ چرخه سلولی را پیش برده، تا مرحله میتوز ارتقا می‌دهد (Varier *et al.*, 2010)، که این فرآیندها می‌تواند در افزایش سرعت و میزان جوانه‌زنی کاملاً مؤثر باشد.

میانگین زمان جوانه‌زنی (MGT) نیز از حدود ۱ روز در شاهد بدون تنش، به حدود ۳/۵ روز در شرایط شوری افزایش یافت اما پرایمینگ با  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در یکی از سطوح زمانی (۶ ساعته) و  $\text{KNO}_3$  در همگی ترکیب‌های زمانی، سبب کاهش میانگین زمان جوانه زنی شد. بهبود میانگین سرعت جوانه‌زنی (MGR) در رابطه با تأثیر تیمارها، وضعیتی مشابه شاخص میانگین زمان جوانه زنی داشت و ضریب سرعت جوانه‌زنی (CVG) نیز توسط  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ۶ ساعته افزایش یافت. به طور کلی، هر سه شاخص ذکر شده نشان‌دهنده تأثیر پرایمینگ در جهت کاهش زمان و افزایش سرعت جوانه‌زنی و خروج ریشه چه در شرایط تنش است. اما بر اساس جدول ۱

میزان حساسیت ساقه و ریشه وجود دارد. اما به طور کلی، عقیده بر آن است که در گیاهان به ویژه در غلات، بین قدرت انتخاب و ورود یون  $\text{K}^+$  نسبت به یون  $\text{Na}^+$  به سلول و میزان مقاومت نسبت به تنش نمکی، یک رابطه خطی و مثبت وجود دارد و یک تفاوت معنی‌دار می‌تواند در میزان قدرت انتخاب اندام‌های هوایی در مقایسه با اندام‌های زیرزمینی وجود داشته باشد (Ben Ahmed *et al.*, 2001).

گزارش‌ها نشان می‌دهد که پرایمینگ می‌تواند در افزایش درصد جوانه زنی نهایی و بنیه بذرهای حساس به تنش و ضعیف مؤثر واقع شود. بر اساس بررسی‌ها، تیمار پرایمینگ با سالیسیلیک اسید، سبب افزایش درصد جوانه زنی، شاخص ویگور و مقدار کلروفیل‌های a و b در شرایط تنش شوری می‌شود (Khomari *et al.*, 2014). بر اساس منابع، بر اثر پیش‌تیمار بذور با  $\text{KNO}_3$ ، افزایش درصد جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه (Ahmadvand *et al.*, 2012)، کاهش میانگین زمان جوانه‌زنی (Sheidaie *et al.*, 2012) و افزایش سرعت جوانه‌زنی (Lara *et al.*, 2014) مشاهده شده است.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنش شوری سبب افت درصد جوانه‌زنی (FGP) شده است، اما پرایمینگ ۳ ساعته با  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$  در زمان‌های ۳، ۶ و ۹ ساعت، همگی سبب ارتقای این شاخص در شرایط تنش شد.

تنش شوری می‌تواند از طریق کاهش پتانسیل اسمزی (Bliss *et al.*, 1986) یا ایجاد سمیت یونی (Hampson and Simpson, 1990) یا از هر دو راه (Huang and Redmann, 1995) سبب افت میزان جوانه‌زنی بذور گردد. اما تیمار با  $\text{KNO}_3$  از طریق کاهش مقدار

می‌رسد که تیمارهای ۱۲ ساعته نترات پتاسیم و سیلیکون، برای پرایمینگ بذور یونجه رقم همدانی در جهت ایجاد تحمل به شوری، گزینه مناسبی نباشند. با وجود این، اگر بهبود وضعیت گیاهچه (و نه جوانه‌زنی بذر) از نظر میزان کلروفیل مورد نظر باشد، ترکیب تیماری ۱۲ ساعته هر دو ماده نیز مفید به نظر می‌رسد.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تنش شوری سبب کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بینه بذر یونجه شاهد در تنش، نسبت به شاهد در آب گردید. مقدار بینه بذر، یعنی شاخص‌های ویگور یک و دو در اثر پرایمینگ با  $\text{KNO}_3$ ، ۳ ساعته افزایش یافتند و به مقدار آن در شاهد در آب رسیدند.

همچنین، بر اساس منابع، پرایمینگ سبب می‌شود که بذور پرایم شده به جوانه‌زنی سریع و پیش‌رونده وادار شده و مقدار و یکنواختی گیاهچه‌های سبز شده در آنها بهبود یابد. ضریب یکنواختی جوانه‌زنی (CUG) در پژوهش حاضر، بر اثر اعمال شوری، از یک مقدار بیشینه در کشت شاهد بدون تنش به یک مقدار کمینه در شاهد در تنش رسید و به میزان ۹۸/۳ درصد کاهش یافت. پرایمینگ، سبب بهبود این شاخص در شرایط تنش نشد، اما کاشت بذور پرایم شده با تیمارهای ۶ و ۹ ساعته  $\text{KNO}_3$  در شرایط بدون تنش، به ترتیب موجب ۱۸ و ۲۷ درصد ارتقای این شاخص نسبت به شاهد در آب و افزایش یکنواختی کشت در شرایط طبیعی شد. نتایج، همچنین نشان داد که در اغلب موارد، شرایط بذور پرایم شده در آب، مشابه شاهد در آب بوده و در موارد کمتر، افت شاخص‌ها برای بذور پرایم شده در آب مشاهده گردید.

تنش شوری سبب کاهش مقادیر کلروفیل a،

اختلافی نیز میان آنها در موارد جزئی نظیر معنی‌دار بودن تأثیر تیمارهای ۱۲ ساعته  $\text{KNO}_3$  و  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  وجود دارد. یک بررسی کلی روی داده‌های این شاخص‌ها نشان می‌دهد که مقادیر این شاخص‌ها (MGR و CVG) در شاهد در آب، به ترتیب: ۳/۲۷، ۳/۲ برابر مقدار آنها در شاهد در تنش بود و برای MGT نیز زمان مورد نظر در شاهد در تنش، ۳/۳ برابر زمان جوانه‌زنی در شاهد در آب بوده است. این مقایسه بین شاخص‌هایی که در واقع بیانگر یک مفهوم هستند، نشان می‌دهد که علیرغم آن که مقادیر در نمونه‌های شاهد آنها تقریباً مشابه بوده و تفاوت‌های جزئی دارد، اما در رابطه با تیمارها، معنی‌دار بودن تأثیر این شاخص‌ها می‌تواند متفاوت باشد. به همین دلیل، با آن که ارزیابی هر سه شاخص، که در واقع همگی بیانگر سرعت جوانه‌زنی هستند، ممکن است بی‌فایده به نظر برسد، اما بررسی و مقایسه فوق‌نشان می‌دهد که نتایج بررسی سه شاخص مزبور به ویژه در رابطه با تأثیر پرایمینگ ۱۲ ساعته دارای تفاوت است.

بنابراین به نظر می‌رسد بررسی و محاسبه شاخص‌های مرتبط در زمینه تأثیر تیمارها سودمند است و می‌تواند به اطمینان محقق جهت گزینش بهترین تیمار بیافزاید. در همین رابطه، تیمار زمانی ۱۲ ساعته در بهبود شاخص میانگین سرعت جوانه‌زنی و زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی در تنش، صرفاً در تیمار  $\text{KNO}_3$  مؤثر بود، در حالی که شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی، ضریب سرعت جوانه‌زنی، ضریب آلومتری، شاخص ویگور یک و دو، اغلب در هر دو تیمار  $\text{KNO}_3$  و  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  تأثیر منفی تیمار ۱۲ ساعته را نشان داده‌اند که در واقع شرایطی بدتر از شاهد در تنش را برای بذور نشان می‌دهد. بر همین اساس، به نظر

منابع، پتاسیم همچنین در برقراری تعادل پتانسیل غشا، تورگر سلولی و تنظیم فشار اسمزی، فعال‌سازی آنزیم‌های دخیل در سنتز پروتئین و کربوهیدرات با تحت تأثیر قرار دادن قابلیت نفوذ غشا، حرکت روزنه‌ها و قطیبت غشا نقش دارد (Preece and Read, 1993; Elumalai *et al.*, Maathuis and Sanders, 1996). در بیشتر تیمارها،  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  در مقایسه با  $\text{KNO}_3$  تأثیر گذاری کمتری بر بهبود شاخص‌ها و القای تحمل بذور به تنش داشت، با این حال، در سه زمان پرایمینگ ۳، ۶ و ۹ ساعت، توانست T50 یا زمان رسیدن به نصف جوانه زنی بذور را کاهش دهد. این ماده همچنین مقادیر کلروفیل‌ها را افزایش داد اما مقدار پرولین در اثر تیمار با آن افزایش نیافت. بررسی‌های Lee و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده است که تیمار گیاه سویا تحت تنش شوری با  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  خارجی سبب افزایش رشد و توسعه گیاه شده و اثر تنش شوری را کاهش می‌دهد. بنابراین، احتمال می‌رود که کاهش مقدار پرولین در بذور پرایم شده‌ای که در شرایط شوری قرار گرفته‌اند، به دلیل افزایش تحمل بذور به شوری و کم شدن آثار سوء آن باشد، زیرا تنش شوری به طور مشخص مقدار پرولین را افزایش می‌دهد. البته با آن که تجمع پرولین در تنش اسمزی به خوبی اثبات شده است، اما هنوز یک توافق کلی در رابطه با نقش پرولین در پاسخ به تنش وجود ندارد (Kavi Kishor *et al.*, 2005). به نقل از Lee و همکاران (۲۰۱۰). برتری قابل توجه مقدار پرولین در شاهد در تنش، به مقدار آن در شاهد در آب و نیز کاهش آن در بذور پرایم شده در جدول ۲ مشاهده می‌گردد.

کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید گردید، در حالی که پرایمینگ آنها را افزایش داد. کاهش مقدار کلروفیل در شوری زیاد می‌تواند به علت افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز (Rao and Rao, 1981) یا تأثیر تخریبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) تولید شده در شرایط تنش باشد (Navari-Izzo *et al.*, 1990). افزایش مقدار کلروفیل گیاه بر اثر تیمارهای  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$  نیز می‌تواند دال بر تخفیف آثار تنش شوری و کاهش صدمه به کلروفیل باشد (Kumar *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014).

بر اساس نظر پژوهشگران، به خوبی مشخص شده است که برای برخی گونه‌های گیاهی بالاتر بودن نسبت  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ممکن است مهم‌تر از پایین نگه داشتن مقدار سدیم باشد (Cuin *et al.*, 2003). اثر مثبت  $\text{KNO}_3$  می‌تواند به علت افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در بذور پرایم شده باشد، گرچه استفاده از مونو پتاسیم فسفات ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) باعث افزایش مقدار کلروفیل‌های a و b، به میزانی که  $\text{KNO}_3$  آن را افزایش داد، نشد (Armand Torab and Madadkar Haghjou, 2015). بنابراین، به نظر می‌رسد عوامل دیگری سبب تأثیر گذاری  $\text{KNO}_3$  شده باشند. نتایج بررسی Lara و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که پرایمینگ بذور گوجه‌فرنگی با  $\text{KNO}_3$  سبب فعال‌سازی و نیز سنتز آنزیم نیترات ردوکتاز (NR) و تولید نیتريت / نیتريك اکساید (NO) شد که علاوه بر افزایش جذب و متابولیسم آنیون نیترات، سنتز نیتريك اکساید و به راه افتادن مسیرهای سیگنالی را موجب می‌گردد. در تحقیق مزبور، همچنین فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی سلول در اثر تأثیر NO مشاهده شد که سبب مقابله بیشتر بذور با تنش گردید. بر اساس

## جمع‌بندی

برای فعل و انفعالات بیوشیمیایی جوانه‌زنی در حین پرایمینگ را کسب نماید. بذور پرایم شده در شرایط بدون تنش (آب) اغلب وضعیتی مشابه بذور پرایم نشده در آب (شاهد در آب) داشتند. برخی موارد، از ارتقای شاخص‌ها بر اثر پرایمینگ حتی بیشتر از شاهد بدون تنش حکایت داشت. در مجموع، تیمارهای پرایمینگ سبب افزایش جوانه‌زنی، کاهش زمان جوانه‌زنی و افزایش رنگدانه‌ها در شرایط تنش شوری شد که می‌تواند بیانگر افزایش سطح تحمل بذر یونجه به تنش شوری باشد.

## سپاسگزاری

نگارندگان از امور پژوهشی دانشگاه لرستان به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌نمایند.

تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم سبب افت شاخص‌های جوانه‌زنی بذر و نیز رشد گیاهچه یونجه رقم همدانی گردید. ترکیب‌های تیماری حاوی  $\text{KNO}_3$  در بهبود شاخص‌های ارزیابی شده از تیمارهای  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  مؤثرتر به نظر رسید. ترکیب‌های تیماری پرایمینگ با مدت زمان‌های کمتری از هر دو تیمار ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و  $\text{KNO}_3$ )، در شرایط تنش شوری، سودمندتر از زمان‌های پرایمینگ ۱۲ ساعته آنها بود، گرچه تیمارهای ۳ و ۶ ساعته  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  و هر سه زمان (۳، ۶ و ۹ ساعت)  $\text{KNO}_3$ ، در بهبود شاخص‌ها، دارای اهمیت بود. این امر که زمان تیمار یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر کارآمدی پرایمینگ است، به این علت است که هر نمونه بذر در یک زمان ویژه، قادر است آمادگی لازم

## منابع

- Abbasian, A. and Moemeni, J. (2013) Effects of salinity stress on seed germination and seedling vigor indices of two halophytic plant species (*Agropyron elongatum* and *A. pectiniforme*). International Journal of Agriculture and Crop Sciences 5(22): 2669-2676.
- Afzal, I., Hussain, B., Basra, S. M. A. and Habib Ullah, S. (2011) Halopriming triggers higher germination potential and early seedling growth of tomato. Journal of Agriculture and Social Science 7(3): 105-108.
- Ahmadvand, G., Soleimani, F., Saadatian, B. and Pouya, M. (2012) Effects of seed priming on germination and emergence traits of two soybean cultivars under salinity stress. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 3(2): 234-241.
- Ahmed, M., Kamran, A., Muhammad, A., Qadeer, U., Ahmed, Z. I. and Goyal, A. (2013) Silicon priming: a potential source to impart abiotic stress tolerance in wheat: A review. Australian Journal of Crop Science 7(4): 484-491.
- Ali Mohammadizad, H., Khazaei, I., Ghafari, M., Fatehi Sinehsar, M. F. and Barzegar, R. (2013) Effect of salt and drought stresses on seed germination and early seedling growth of *Nepeta persica*. International Journal of Farming and Allied Sciences 2(21): 895-899.
- Amooaghaei, R. (2011) The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under salt stress. African Journal of Biotechnology 10(33): 6269-6275.
- Amoo-Zad-Khalili, Z., Mohamadi Todashki, M. R. and Eshraghi-Nejad, M. (2013) The effect of hydro and osmo ( $\text{ZnSO}_4$ ) priming on seed germination characteristics under salt ( $\text{NaCl}$ ) stress on *Silybum marianum* (Milk thistle) seeds. International Journal of Agriculture and Crop Sciences

- 5(24): 2979-2984.
- Arab, L. and Ehsanpour, A. A. (2012) Improvement of some physiological responses of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under in vitro salt stress using triadimefon. *Progress in Biological Sciences* 3(1): 31-40.
- Armand Torab, K. and Madadkar Haghjou, M. (2015) The effect of monopotassium phosphate priming on growth and germination in *Medicago sativa*. 1<sup>st</sup> National Conference of Agriculture, Koohdasht, Iran (in Persian).
- Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2005) Pre-sowing seed treatment a shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy* 88: 223-269.
- Azooz, M. M. (2009) Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Agriculture and Biology* 11(4): 343-350.
- Bar, Y., Apelbaum, A., Kafkafi, U. and Goren, R. (1997) Relationships between chloride and nitrate and its effect on growth and mineral composition of avocado and citrus plants. *Journal of Plant Nutrition* 20(6): 715-731.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39(1): 205-207.
- Batool, A., Ziaf, K. and Amjad, M. (2015). Effect of halo-priming on germination and vigor index of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Journal of Environmental and Agricultural Sciences* 2(7): 1-8.
- Ben Ahmed, H., Zid, E. and Grignon, C. (2001) Salt sensitivity and K/Na selectivity in *Setaria verticillata*. *Plant Nutrition* 92: 418-419.
- Berg, W. K., Cunningham, S. M., Brouder, S. M., Joern, B. C., Johnson, K. D. and Volenec, J. J. (2005) Influence of phosphorus and potassium fertilization on alfalfa yield and yield components. *Crop Science* 45(1): 297-304.
- Bliss, R. D., Plattaloia, K. A. and Thomson, W. W. (1986) Osmotic sensitivity in relation to salt sensitivity in germinating barley seeds. *Plant Cell and Environment* 9(9): 721-725.
- Blomster, T., Salojärvi, J., Sipari, N., Brosché, M., Ahlfors, R., Keinänen, M., Overmyer, K. and Kangasjärvi, J. (2011) Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157(4): 1866-1883.
- Bradford, K. J. (1986) Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Horticultural Science* 21(5): 1005-1112.
- Chen, K. and Arora, R. (2011) Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Science* 180(2): 212-220.
- Chen, K. and Arora, R. (2013) Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 94: 33-45.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S. and Sompornpailin, K. (2011) High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. *spp. indica*. *Australian Journal of Crop Science* 5(10): 1191-1198.
- Cuin, T. A., Miller, A. J., Laurie, S. A. and Leigh, R. A. (2003) Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54(383): 657-661.



- Darvishi, B., Poustini, K. and Tavakol-Afshari, R. (2005) Photosynthetic reaction of four native cultivars of alfalfa of Iran to salinity stress. *Journal of Agriculture Science of Iran* 36(6): 1529-1538 (in Persian).
- De Castro, R. D., van Lammeren, A. A., Groot, S. P., Bino, R. J. and Hilhorst, H. W. (2000) Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology* 122(2): 327-336.
- Dobrenz, A., Robinson, D. and Smith, S. (1986) Improving the germination salt tolerance of alfalfa. In: *Forage and Grain Reports*. Univeristy of Arizona, Cooperature Extension Service Press, Arizona.
- Ebadi Almas, D., Bagherikia S. and Mahdavi Mashaki, K. (2013) Effects of salt and water stresses on germination and seedling growth of *Artemisia vulgaris* L.. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 56(11): 762-765.
- Elumalai, R. P., Nagpal, P. and Reed, J. W. (2002) A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell* 14(1): 119-131.
- Farooq, M., Aziz, T., Basra, S. M. A., Cheema, M. A. and Rehman, H. (2008) Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194(2): 161-168.
- Hampson, C. R. and Simpson, G. M. (1990) Effects of temperature, salt and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*) germination. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 68(3): 524-528.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M. (2013) Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (Eds Ahmad, P., Azooz, M. M. and Prasad, M. N. V.) 25-87. Springer, New York.
- <http://www.maj.ir/portal/File/ShowFile.aspx?ID=95f9affc-8eb0-44f8-8113-1a23cf5bb07c>. Retrieved from: www.maj.ir On: 27 June 2015.
- Huang, J. and Redmann, R. E. (1995) Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science* 75(4): 815-819.
- Jisha, K. C. and Puthur, J. T. (2014) Halopriming of seeds imparts tolerance to NaCl and PEG induced stress in *Vigna radiata* (L.) Wilczek varieties. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20(3): 303-312.
- Jones, K. W. and Sanders, D. C. (1987) The influence of soaking pepper seed in water or potassium salt solutions on germination at three temperatures. *Journal of Seed Technology (USA)* 11(1): 97-102.
- Kader, M. A. (2005) A comparison of seed germination calculation formulae and the associated interpretation of resulting data. *Royal Society of New South Wales* 135: 65-75.
- Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri-Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 424-438.
- Kayani, S. A., Nagvi, H. and Ting, I. P. (1990) Salinity effects on germination and mobilization of reserves in jobjob seed. *Crop Science* 30(3): 704-708.
- Keiffer, C. and Ungar, I. (1997) The effect of extended exposure to hypersaline conditions on the germination of five inland halophyte species. *American Journal of Botany* 84: 104-111.

- Khodabandeh, N. (2009) Cultivation of forage plants. Nashr-e-Elm-e-Keshavarzi Press, Tehran (in Persian).
- Khomari, S., Soltani-nezhad, M. and Sedghi, M. (2014) Effect of seed vigour and pretreatment on germinability and seedling growth of safflower under drought and salinity conditions. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 3(12): 1229-1233.
- Kumar, S., Bose, B. and Pradhan, N. (2014) Potassium nitrate priming affects the activity of nitrate reductase and chlorophyll content in late sown sesame (*Sesamum indicum* L.). *Trends in Biosciences* 7: 4466-4470.
- Labouriau, L. G. (1970) On the physiology of seed germination in *Vicia graminea* Sm. I. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42: 235-262.
- Lara, T. S., Lira, J. M. S., Rodrigues, A. C., Rakocevic, M. and Alvarenga, A. A. (2014) Potassium nitrate priming affects the activity of nitrate reductase and antioxidant enzymes in tomato germination. *Journal of Agricultural Science* 6(2): 72-80.
- Lee, S. K., Sohn, E. Y., Hamayun, M., Yoon, J. Y. and Lee, I. J. (2010) Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant growth under hydroponic system. *Agroforestry Systems* 80(3): 330-340.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods of Enzymology* 148: 350-382.
- Maathuis, F. J. M. and Sanders, D. (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiologia Plantarum* 96(1): 158-168.
- Manaa, A., Mimouni, H., Terras, A., Chebil, F., Wasti, S., Gharbi, E. and Ben Ahmed, H. (2014) Superoxide dismutase isozyme activity and antioxidant responses of hydroponically cultured *Lepidium sativum* L. to NaCl stress. *Journal of Plant Interactions* 9(1): 440-449.
- Moemeni, A. (2010) Geographical distribution and salinity levels of soil resources of Iran. *Journal of Soil Researches (Soil and Water Sciences)* 24: 203-215 (in Persian).
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25(2): 239-250.
- Najari, S., Sepehri, A., Seyedi, M. and Zahedi, M. (2011) Effect of osmo priming sodium carbonate in different cultivars seeds of *Medicago sativa* L. under salt stress. 1<sup>st</sup> National Conference of New Topics in Agriculture, University of Saveh, Saveh, Iran (in Persian).
- Nakagami, H., Pitzschke, A. and Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends in Plant Science* 10(0037): 339-346.
- Nakaune, M., Hanada, A., Yin, Y-G., Matsukura, C., Yamaguchi, S. and Ezura, H. (2012) Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 52: 28-37.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F. and Izzo, R. (1990) Water-stress induced changes in protein and free amino acids in field grown maize and sun flower. *Plant Physiology and Biochemistry* 28(4): 531-537.
- Norouzi Haroni, N., Tabari, M. and Dey, D. (2015) Effect of halopriming treatment on seed germination and seedling emergence of Judas tree (*Cercis siliquastrum* L., Caesalpiniaceae) from Zanjan, Iran. *African Journal of Agricultural Research* 10(23): 2355-2362.
- Overlach, S., Diekmann, W. and Raschke, K. (1993) Phosphate translocator of isolated guard-cell chloroplasts from *Pisum sativum* L. transport glucose-6-phosphate. *Plant Physiology* 101(4): 1201-

- 1207.
- Pitman, M. G. and Läuchli, A. (2002) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. Salinity, environment plants molecules. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Preece, J. E. and Read, P. E. (1993) Mineral nutrition, the biology of horticulture crop. 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- Pujol, J. A., Calvo, F. J. and Ramírez-Díaz, L. (2000) Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from southeastern Spain. *Annals of Botany* 85(2): 279-286.
- Ranal, M. A. and Santana, D. G. (2006) How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 1-11.
- Rao, G. G. and Rao, G. R. (1981) Pigment composition and chlorophyllase activity in pigeon pea (*Cajanus indicus*) and gingelly (*Sesamum indicum*) under NaCl salinity. *Indian Journal of Experimental Biology* 19: 768-770.
- Rezai, S., Orojloo, M., Shirani Bidabadi, S. and Soleimanzadeh, M. (2013) Possible role of methyl jasmonate in protection to NaCl-induced salt stress in pepper cv. Green Hashemi. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6(17): 1235-1238.
- Salehzade, H., Izadkhan Shishvan, M., Ghiyasi, M., Forouzin, F. and Abbasi Siyahjani, A. (2009) Effect of seed priming on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Research Journal of Biological Sciences* 4(5): 629-631.
- Shams-Esfandabadi, R., Shariati, M. and Modares-Hashemi, S. M. (2005) Study of some dormancy breacking treatments in five pronances of *Stipa barbata* Desf. *Journal of Biology of Iran* 18(1): 48-59 (in Persian).
- Shannon, M. (1984) Breeding selection and genetics of salt tolerance. In: *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement* (Eds. Staples, R. C. and Toenniessen, G. H.) 300-308. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Sheidaie, S., Sadeghi, H., Yari, L., Oskouei, B. and Rahmani, M. (2012) Effect of seed treatments on germination indices of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids under drought stress conditions. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 2(7): 157-161.
- Singh, B. and Ushu, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Growth Regulators* 39(2): 137-141.
- Smith, S. E. (1984) Salinity and the production of alfalfa. In: *Plant and crop stress* (Ed. Pessaraki, M.) Marcel Dekker Press, New York.
- Soltani, A., Khodarahmpour, Z. and Ashraf Jafari, A. (2012) Study of genetic diversity tolerance to salinity stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties basis on seedling growth. *Journal of Crop Breeding* 4(10): 29-45 (in Persian).
- Summers, C. G. (1998) Integrated pest management in forage alfalfa. *Integrated Pest Management Reviews* 3: 127-154.
- Taize, L. and Ziger, E. (2000) *Plant physiology*. 3<sup>rd</sup> edition. Sinauer Associates, Sunderland.
- Timson, J. (1965) New method of recording germination data. *Nature* 207: 216-217.
- Torabi, F., Majd, A. and Enteshari, S. (2012) Effect of exogenous silicon on germination and seedling establishment in *Borago officinalis* L.. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(10): 1896-1901
- Torabi, M., Halim, R. A., Sinniah, U. R. and Choukan, R. (2011) Influence of salinity on the germination of Iranian alfalfa ecotypes. *African Journal of Agricultural Research* 6: 4624-4630.

- Torabian, A. R. (2010) Effect of salicylic acid on germination and growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedling under water potential loss at salinity stress. *Plant Ecophysiology* 2(4): 151-155.
- Variar, A., Kuriakose Vari, A. and Dahlani, M. (2010) The subcellular basis of seed priming. *Current Science* 99(4): 450-456.
- Wang, S., Guo, S., Li, J., Hu, X. and Jiao, Y. (2006) Effects of salt stress on the root growth and leaf water use efficiency of cucumber seedlings. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 17(10): 1883-1888.
- Wang, Y., Li, K. and Li, X. (2009) Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 166(15): 1637-1645.
- West, G., Inze, D. and Beemster, G. T. (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiology* 135(2): 1050-1058.
- Wojtyla, Ł., Kubala, S., Lechowska, K. and Garnczarska, M. (2013) Modulation of antioxidative metabolism in response to osmopriming in *Brassica napus* seeds improves germination under salt stress. *Biotechnologia* 94(3): 374-410.
- Zhang, H., Irving, L. J., McGill, C. Matthew, C., Zhou, D. and Kemp, P. (2010) The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. *Annals of Botany* 106(6): 1027-1035.
- Zolla, G., Heimer, Y. M. and Barak, S. (2010) Mild salinity stimulates a stress -induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Experimental Botany* 61(1): 211-224.

## Improvement of *Medicago sativa* seed tolerance to salt stress by Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub> treatments at different time levels

Kiomars Armand Torab <sup>1</sup>, Maryam Madadkar Haghjou <sup>1\*</sup> and Ahmad Ismaili <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>2</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

### Abstract

Opposition to destructive and side effects of salt stress, have limited suitable water and soil sources for plant culturing, is possible by increasing the tolerance level of seeds and seedlings. In present research, the effect of priming technique was studied with Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> or KNO<sub>3</sub> in 3, 6, 9 and 12 hours on *Medicago sativa* cv. Hamadani in response to 200 mM salt stress. Salinity caused a decrease of most of germination and growth indices from seeds and seedlings, whereas 3h-Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> priming increased final germination percentage (FGP) and (3/6/9h)-KNO<sub>3</sub> increased FGP, coefficient velocity of germination (CVG), compared to control. An improvement in mean germination rate (MGR) and mean germination time (MGT) was shown by 6h-Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and all KNO<sub>3</sub> treatment times and increase of Vigor index (I) was observed at 3h-KNO<sub>3</sub>. Pretreatment with (3/6/9h)-Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and all h-KNO<sub>3</sub> decreased T50 at stress and in non stress conditions, 9h-Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and 9h-KNO<sub>3</sub> caused a decrease in mean daily germination (MDG) and an increase in Timson index and improvement of coefficient uniformity of germination (CUG). 12 hour treatments from both substances exacerbated the conditions and decreased the FGP, Vig (I) and (II) and decreased CVG. All-Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and (9/12)-KNO<sub>3</sub> decreased the dry weight of shoots at stress. Proline was raised only with KNO<sub>3</sub> and salt affected pigments negatively and priming increased them. In conclusion, priming elevated tolerance to salt stress and treatment compositions with the lower times were more efficient.

**Key words:** KNO<sub>3</sub>, *Medicago sativa* cv. Hamadani, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, Priming, Salt stress

---

\* Corresponding Author: madadkar.m@lu.ac.ir

## Effect of silicon and nanosilicon on reduction of damage caused by salt stress in maize (*Zea mays*) seedlings

Hamid Reza Zare, Zohreh Ghanbarzadeh, Assieh Behdad, Sasan Mohsenzadeh \*

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

### Abstract

Salinity reduced the efficiency of agricultural production like maize as one of the most important cereals for food and oil for humans. Silicon is the second most abundant element in the soil and alleviates the biotic and abiotic stresses in plants. The aim of this study is evaluate the effect of silicon and nanosilicon on improvement of salt stress in maize (*Zea mays*). For this propose, the interaction between the effects of different levels of salinity (0 and 100 mM), silicon and nanosilicon (50, 100 and 150 mg /mL) was studied in completely randomized block design with factorial experiments and with three replications. The results showed that salinity significantly decreased root and shoot growth, amount of chlorophyll and carotenoid pigments, protein and potassium contents, compared to control. Treating plants with silicon and nanosilicon caused reduction of salinity effects and increase above indices. Salinity stress also caused a significant increase in proline, anthocyanin and soluble carbohydrate contents, lipid peroxidation, and catalase activity and treatment with silicon and nanosilicon alleviates effects of salt stress and reduced the amount of above indices. 150 mg/mL of nanosilicon showed the maximum effect on diminishing negative effects of salt stress on all examined parameters. So, the use of this element is proposed as alleviator of salt stress on maize.

**Key words:** Salinity, *Zea mays*, Silicon, Nanosilicon

**An investigation of changes in antioxidant enzymes activities  
and secondary metabolites of thyme (*Thymus vulgaris*) seedlings  
under *in vitro* salt stress**

**Roya Razavizadeh \* and Nasim Mohagheghyan**

Department of biology, Payame Noor Universtiy, PO BOX 19395-3697 Tehran, IRAN

**Abstract**

Salinity is one of the major factors limiting the growth of plants that threaten the sustainability of agriculture in vast areas of the world. It seems that the evaluation of medicinal plants such as thyme due to food, pharmaceutical and health is essential under salinity stress to discover its benefits of economic and health. This study was designed to investigate the effect of salinity on physiological parameters, biochemical and secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*) under *in vitro* culture conditions. Thyme seedlings grown from the seeds, 4 weeks after growth at 16 hours of light and 8 hours of dark and at temperature of 25±1 °C in the growth chamber, were transferred to MS (Murashige and skoog) medium containing different concentrations of NaCl (0, 80, 100, 120 and 150 mM) and 25 days after the subculture, physiological parameters such as antioxidant enzymes activities and active pharmaceutical ingredients were measured. 25 days after salt treatment, the chlorophyll a, b, total chlorophyll, carotenoids, and total soluble protein content were significantly decreased with increasing NaCl concentration, whereas increasing the salt concentration increased carbohydrates, proline and phenolics in thyme seedlings. Also salinity led to a significant increase in the activity of antioxidant enzymes. GC-Mass analysis showed that the productions of secondary metabolites were greatly affected by salinity. By increasing salinity level of P-cymene and Gama Terpinene increased and Thymol decreased. In general, it was observed that salinity with changes the physiological and biochemical parameters and the amount of active ingredients of Thyme can change the value of its medicinal properties.

**Key words:** Antioxidant enzymes, *In vitro*, Salt stress, Secondary metabolites, Thyme

---

\* Corresponding Author: razavi.roya@gmail.com

## Induction of defensive responses and production of secondary metabolites in *Linum album* cell culture by ultrasound

Armaghan Abedzadeh Neyshabouri<sup>1</sup> and Ayatollah Rezaei<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

<sup>2</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

### Abstract

Ultrasound (US) with low intensity is considered as a physical tool to stimulate living systems in medicine and biotechnology. This study aim to survey the US effects on some physiological parameters and podophyllotoxin production in *Linum album* cell culture. The cell cultures were treated with US waves with a frequency of 40 kHz and the power 5 Wcm<sup>-3</sup>, in a time dependent experiment with 3 replicates and the cells were collected at 24, 48 and 72 h after the treatment. Evaluated parameters were cell growth, contents of total protein, MDA, hydrogen peroxide, phenolics, flavonoids, activity of peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase and podophyllotoxin. The results showed that cell growth was significantly decreased by the US, but there was no significant change in protein content. The amount of hydrogen peroxide, membrane lipid peroxidation and activity of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase enzymes were increased in cells under the effect of US, compared to control. Also US increased the production of phenolic compounds, flavonoids and podophyllotoxin in treated cells. Maximum amount of podophyllotoxin was obtained in treated cultures after 72 hours which was the 268.9 µg/g DW (2.7 times that of the control). It seems that US by stimulating cells and induction of defensive responses and secondary metabolism increased the amount of podophyllotoxin in cells of *Linum album* plant.

**Key words:** Ultrasound, *Linum album*, Cell culture, Podophyllotoxin

---

\* Corresponding Author: arezaei@shahed.ac.ir



## Evolutionary trend of morphological characters of *Astragalus tawilicus*, *Astragalus dictyolobus* and *Astragalus victoriae* based on phylogeny of cpDNA *matK* sequences

Farahnaz Javanmardi \*

Department of Biology, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran

### Abstract

Evolutionary trend of morphological characters of *Astragalus dictyolobus*, *A. tawilicus* (previously classified in section *Laxiflori*) and *A. victoriae* (previously classified in section *Chrstianophysa*) with other species of section *Alopecuroidei* based on phylogeny of cpDNA *matK* sequences is presented. 25 taxa belonging to section *Alopecuroidei* as well as *A. bassineri* and *A. sieversianus* belonging to section *Astragalus* as outgroups were analysed. 12 vegetative and generative characters were selected and different states of them based on phylogeny of cpDNA *matK* sequences were analyzed. The present analysis revealed that state of pod in calyx, density and shape of inflorescence were not in agreement with results of molecular data and indicated the artificial nature of these characters in previous classification of section *Alopecuroidei*. Presence of bracteole and shape of ovary were consistent with phylogeny of cpDNA *matK* sequences. Presence of peduncle in *A. dictyolobus* and *A. tawilicus* demonstrated that they are well allied with other species of section *Alopecuroidei*. Lax inflorescence makes *A. victoriae* relative to *A. dictyolobus* and *A. tawilicus*. Other mentioned characters except lax inflorescence make it relative to section *Alopecuroidei*.

**Key words:** *Astragalus dictyolobus*, *A. tawilicus*, *A. victoriae*, cpDNA *matK*, Morphology

## Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of *Nicotiana rustica* triggered by ethanolamine pretreatment under *in vitro* salt stress condition

Somayeh Rajaiean, Ali Akbar Ehsanpour \* and Mohammad Amin Toghiani

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

### Abstract

Salt stress is one of the most important factors that endanger plant growth and production all around the world. Application of compounds which increase plant resistance to salt stress obviously has significant importance in reduction of economic losses. One of these compounds is the biological alcohol called ethanolamine, and the present study aimed to understand the way by which ethanolamine exerts its protecting effect against salt stress. For this purpose, 4-week-old *Nicotiana rustica* plants which had been kept in MS medium were pretreated with ethanolamine and 2 days later they were transferred to MS medium supplemented with 200 mM NaCl for 3 weeks. The our results revealed that *Nicotiana rustica* plants pretreated with exogenous ethanolamine showed elevated level of TAL activity and anthocyanin content whereas PAL activity was decreased, and reduced level of MDA, total flavonoid and phenol content in plants under salt stress condition. According to these results, it can be suggested that ethanolamine exerts its protective effect by anthocyanin content increase.

**Key words:** *Nicotiana rustica*, Ethanolamine, Phenol, Tyrosine ammonia lyase, Phenyle alanin ammonia lyase, salt stress



# Iranian Journal of Plant Biology

7<sup>th</sup> Year, No. 26, Winter 2015

ISSN (Print): 2008-8264

ISSN (Online): 2322-2204

## Contents

- **Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of *Nicotiana rustica* triggered by ethanolamine pretreatment under *in vitro* salt stress condition** ..... 1  
Somayeh Rajaeian, Ali Akbar Ehsanpour and Mohmmad Amin Toghyani
  
- **Evolutionary trend of morphological characters of *Astragalus tawilicus*, *Astragalus dictyolobus* and *Astragalus victoriae* based on phylogeny of cpDNA *matK* sequences** ..... 2  
Farahnaz Javanmardi
  
- **Induction of defensive responses and production of secondary metabolites in *Linum album* cell culture by ultrasound** ..... 3  
Armaghan Abedzadeh Neyshabouri and Ayatollah Rezaei
  
- **An investigation of changes in antioxidant enzymes activities and secondary metabolites of thyme (*Thymus vulgaris*) seedlings under *in vitro* salt stress** ..... 4  
Roya Razavizadeh and Nasim Mohagheghiyani
  
- **Effect of silicon and nanosilicon on reduction of damage caused by salt stress in maize (*Zea mays*) seedlings** ..... 5  
Hamid Reza Zare, Zohreh Ghanbarzadeh, Assieh Behdad, Sasan Mohsenzadeh
  
- **Improvement of *Medicago sativa* seed tolerance to salt stress by Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub> treatments at different time levels** ..... 6  
Kiomars Armand Torab, Maryam Madadkar Haghjou and Ahmad Ismaili

## Referees committee (7<sup>th</sup> Year, No. 26, Winter 2015)

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. Jannat Sarmad	University of Guilan
Dr. Sedigheh Esmailzadeh Bahabadi	University of Zabol
Dr. Mohammad Bagher Bagherieh-Najjar	Golestan University
Dr. Latifeh Pourakbar	Urmia University
Dr. Parissa Jonoubi	Kharazmi University
Dr. Ali Akbar Ehsanpour	University of Isfahan
Dr. Monireh Ranjbar	Islamic Azad University, Falavarjan Branch
Dr. Leila Shabani	Shahrekord University
Dr. Reza Sheikhabari Mehr	University of Qom
Dr. Rayhaneh Amooaghaie	Shahrekord University
Dr. Roya Razavizadeh	Payame Noor University
Dr. Majid Ghorbani Nahooji	Iranian Institute of Medical Plants
Dr. Ali Akbar Ghotbi Rravandi	Researcher
Dr. Faezeh Ghanati	Tarbiat Modares University
Dr. Shahrokh Kazempour Osaloo	Tarbiat Modares University

**Iranian Journal of Plant Biology (Scientific Research Journal)**

**7<sup>th</sup> Year, No. 26, Winter 2015**

**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**

<b>Dr. Ali Akbar Ehsanpour</b> (Ph.D)	Professor - University of Isfahan
<b>Dr. Faezeh Ghanati</b> (Ph.D)	Associate Professor - Tarbiat Modares University
<b>Dr. Ali Asghar Maassoumi</b> (Ph.D)	Professor - Research Institute of Forests and Rangelands
<b>Dr. Mohammad Reza Rahiminejad</b> (Ph.D)	Professor - University of Isfahan
<b>Dr. Mansour Shariati</b> (Ph.D)	Professor - University of Isfahan
<b>Dr. Shahin Zare Mobarakeh</b> (Ph.D)	Professor - University of Tehran
<b>Dr. Mohammad Reza Zamani</b> (Ph.D)	Professor - National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

**Executive and Manuscript Manager:** Fariba Hadian

**Scientific English Editor:** Dr. Kazem Negaresh

**Scientific Editor and Professional Layout Designer:** Fariba Hadian

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

---

**Publication and Lithography:** University of Isfahan Publications

**Publisher:** University of Isfahan

**Published:** Spring 2016

# **Iranian Journal of Plant Biology**

**7<sup>th</sup> Year, No. 26, Winter 2015**

**Published by  
University of Isfahan Research Center**