



عنوان مقالات

- ۴۲۵..... ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های کلکسیون عتاب ایران (*Ziziphus* spp.) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR
هاجر شایسته - سعید ملک زاده شافارودی - کمال غوث - مرجع الله شهریار
- ۴۳۸..... بهینه‌سازی عوامل موثر در ازدیاد درون شیشه‌ای پایه میروبالان ۹c
زهرا شعبانی بهرام عابدی - ابراهیم گنجی مقدم - علی تهرانی فر
- ۴۴۸..... برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه با استفاده از پارامترهای زود یافت خاک و شبکه عصبی مصنوعی
حسین صیوری فرد - عظیم قاسم نژاد - خدایار جمعی - یوحنا هزرجربی - محمود رضا بهرامی - قیومه نصرتی
- ۴۵۷..... اثر کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم همراه با کود دامی بر شاخص‌های فیزیوشیمیایی میوه و برگ خرما (*Phoenix dactylifera* L.)
الیاس آریاکیا - حمید رضا روستا - ناهید رحیمی زاده
- ۴۶۹..... اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی لاله واژگون *Fritillaria imperialis* L.
اسماعیل چینی - مرضیه قمری - مهدی محب - الدینی - علیرضا قنبری - حمیدرضا حیدری
- ۴۸۳..... تعیین زمان برداشت و عمر انبارمانی مناسب میوه نارنگی کینو در شهرستان جیرفت
سید مهدی میری - میثم سالاری - احمد احمدپور
- ۴۹۲..... بررسی تاثیر کاربرد اکسید نیتریک بر کاهش اثرات نامطلوب سرما بر میوه پرتقال واشگتن ناول (*Citrus sinensis* L. cv. Washington Navel)
بهاره قربانی - زهره پاک کیش
- ۵۰۵..... مطالعه تاثیر کادمیم، روی و زنولیت بر خصوصیات فیزیومورفولوژیکی گل راعی (*Hypericum perforatum* L.)
ژاله زندوی فرد - مجید عزیزی - حسین آروبی - اسیر فتوت
- ۵۱۷..... بررسی اثر سالیسیلیک اسید در جلوگیری از آسیب سرما در گوجه فرنگی گیلاسی (*Lycopersicon esculentum* cv. Messina)
حنیفه سید حاجی زاده - شهلا صفحانی
- ۵۳۳..... تاثیر تاریخ کاشت بر عملکرد و تجمع نیترات اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) در شرایط آب و هوایی اصفهان
پیمان جعفری - امیر هوشنگ جلالی
- ۵۴۳..... بررسی اثر نوع خاکپوش پلی اتیلنی بر رشد و عملکرد سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)
خسرو پرویزی - محمد رضا حسندخت - پنا آزاد
- ۵۵۵..... اثر رقم و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای لیلوم با استفاده از ریزنمونه‌های TCL
احمد شربی - فاطمه کیخا آخر - محبزه یزدی - عبدالرضا باقری
- ۵۶۵..... تاثیر فورکلورنورون بر پیازچه‌زایی، ترکیبات فینوشیمیایی و خواص آنتی اکسیدانی موسیر (*Allium hirtifolium*)
نسرتین غره‌ادی - سعیده علیزاده سادق
- ۵۷۷..... اثر محلول پاشی برخی عناصر ریز مغذیدر قبل و بعد از گلدهی بر ویژگی‌های کمی و کیفی میوه انگور رقم "خوشناو"
زهرا دوزخ‌خواه - بیژن کاوسی
- ۵۹۰..... تاثیر سطوح مختلف کم‌آبی بر برخی صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی
سید موسی موسوی - مهرانگیز چهارازی - اسماعیل خالقی

Contents

- Evaluation of Genetic Diversity in Collection from Iranian Jujube Ecotypes (*Ziziphus* spp.) using ISSR-molecular Marker437
H. Shayesteh - S. Malekzadeh Shafaroudi - K. Ghouth - F. Shahriari
- Optimization of Factors Affecting in vitro Propagation of 'Myrobalan 9c' Rootstock447
Z. Shabani - B. Abedi - E. Ganjimoqhadam - A. Tehranifar
- Assessment of Summe Savory (*satureja hortensis* L.) Biomass by Easily-Attainable Soil Parameters and Artificial Network456
H. Sabourifard - A. Ghasemnezhad- Kh. Hemmati- A. Hezarjeribi, M.R. Bahrami- F. Nosrati
- Effects of Cow Manure, Ammonium Sulfate and Potassium Sulfate on Physico-Chemical Indices of Fruit and Leaf of Mazafati Date (*Phoenix Dactylifera* L.)468
E. Aryakia - H.R. Roosta- N. Rahmizade
- Effect of Plant Growth Regulators on Callogenesis and Regeneration Of *Fritillaria imperialis* L482
Es. Chamani - M. Ghamari- M. Mohebodini- A.R. Ghanbari- H.R. Heydari
- Determining Appropriate Harvesting Date and Storage Life of Kinnow Mandarin Fruits in Jiroft County491
S. M. Miri - M. Salari - A. Ahmadpour
- Effect of Nitric Oxide Application on Reduction of Undesirable Effects of Chilling on Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L.) Fruit During Storage504
B. Ghorbani - Z. Pakkish
- The Effect of Cadmium, Zinc and Zeolite Application on Physiomorphological Characteristics of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)516
Zh. Zandavifard - M. Azizi- H. Aroiee- A. Fotovat
- Effect of Salicylic Acid on Prevention of Chilling Injury of Cherry Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Messina)532
H. Seyed Hajizadeh - Sh. Salkhani
- The Effect of Planting Date on Yield and Nitrate Accumulation in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) in Esfahan Weather Conditions542
P. Jalari - A. Jalali
- Effect of Different Plastic mulch on Growth and Yield of Potato (*Solanum tuberosum*)554
Kh. Parvizi - M.R. Hassandokht - B. Azad
- Effect of Cultivar and Plant Growth Regulators on *In vitro* Regeneration of *Lilium* Spp. Utilizing Thin Cell Layer Explants564
A. Sharifi - F. Keykha Akhar- M. Yazdi- A. Bagheri
- The Effect of Forchlorfenuron Bulblet Formatioxidant Characteristics and Phytochemicals Compounds of Persian Shallot (*Allium hirtifolium*)576
N. Farhadi - S. Alizadeh Saltch
- Effect of Foliar Spray of Some Micronutrient Elements before and after Flowering on Quantitative and Qualitative Characteristics of Table Grape cv. Khoshnaw589
Z. Davarkhah- B. Kavvosi
- The Effect of Water Deficit Different Levels on Antioxidant System and Lipid Peroxidation in two Species *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* of Marigold598
S. M. Mousavi - M. Chehrizi - E. Khaleghi

نشریه علوم باغبانی

(علوم و صنایع کشاورزی)

26524

21/2015

با شماره پروانه _____ و درجه علمی - پژوهشی شماره _____
از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
73/10/19 68/4/11

پایین 1396

شماره 3

جلد 31

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد
مدیر مسئول: رضا ولی زاده
سردبیر: علی تهرانی فر

استاد - تغذیه نشخوارکنندگان (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه فردوسی مشهد)

اعضای هیات تحریریه:

استاد - علوم باغبانی (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - میوه کاری (دانشگاه تهران)
استاد - گیاهان دارویی (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
استاد - ژنتیک و اصلاح نباتات (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - گلکاری و مهندسی فضای سبز (دانشگاه تهران)
استاد - زیست شناسی (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه صنعتی اصفهان)

تهرانی فر، علی
داوری نژاد، غلامحسین
طلایی، علیرضا
عزیزی، مجید
عبادی، علی
فارسی، محمد
کافی، محسن
لاهوئی، مهرداد
مبلی، مصطفی

چاپ: چاپخانه دانشگاه فردوسی مشهد

ناشر: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد

نشانی: مشهد - کد پستی 91775 صندوق پستی 1163 دانشکده کشاورزی - دبیرخانه نشریات علمی -
نشریه علوم باغبانی نمابر: 8787430

این نشریه در پایگاههای زیر نمایه شده است:

پایگاه استنادی علوم ایران (ISC) پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)

پست الکترونیکی: Jhorts4@um.ac.ir

مقالات این شماره در سایت <http://jm.um.ac.ir> به صورت مقاله کامل نمایه شده است.

این نشریه به تعداد 4 شماره در سال چاپ و منتشر می شود.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

- 425 ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های کلکسیون عتاب ایران (*Ziziphus spp.*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR
هاجر شایسته - سعید ملک زاده شفارودی - کمال غوث - فرج الله شهریاری
- 438 بهینه‌سازی عوامل موثر در ازدیاد درون شیشه‌ای پایه میروبالان 9c
زهره شعبانی - بهرام عابدی - ابراهیم گنجی مقدم - علی تهرانی فر
- 448 برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه با استفاده از پارامترهای زودیاقت خاک و شبکه عصبی مصنوعی
حسین صبوری فرد - عظیم قاسم نژاد - خدایار همتی - ابوطالب هزارجریبی - محمودرضا بهرامی - فهیمه نصرتی
- 457 اثر کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم همراه با کود دامی بر شاخص‌های فیزیوشیمیایی میوه و برگ خرما
(*Phoenix dactylifera L.*) رقم مضافتی
الیاس آریاکیا - حمید رضا روستا - ناهید رحمی زاده
- 469 اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی لاله واژگون *Fritillaria imperialis L.*
اسماعیل چمنی - مرضیه قمری - مهدی محب‌الدینی - علیرضا قنبری - حمیدرضا حیدری
- 483 تعیین زمان برداشت و عمر انبارمانی مناسب میوه نارنگی کینو در شهرستان جیرفت
سید مهدی میری - میثم سالاری - احمد احمدپور
- 492 بررسی تاثیر کاربرد اکسید نیتریک بر کاهش اثرات نامطلوب سرما بر میوه پرتقال واشنگتن ناول (*Citrus sinensis L. cv.*)
Washington Navel طی انبارداری
بهاره قربانی - زهرا پاک کیش
- 505 مطالعه تأثیر کادمیم، روی و زئولیت بر خصوصیات فیزیومورفولوژیکی گل راعی (*Hypericum perforatum L.*)
ژاله زندوی فرد - مجید عزیزی - حسین آروبی - امیر فتوت
- 517 بررسی اثر سالیسیلیک اسید در جلوگیری از آسیب سرما در گوجه فرنگی گیلاسی (*Lycopersicon esculentum cv. Messina*)
حنیفه سید حاجی زاده - شهلا صفحانی
- 533 تاثیر تاریخ کاشت بر عملکرد و تجمع نیترات اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) در شرایط آب و هوایی اصفهان
پیمان جعفری - امیر هوشنگ جلالی
- 543 بررسی اثر نوع خاک پوش پلی اتیلنی بر رشد و عملکرد سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)
خسرو پرویزی - محمد رضا حسندخت - بیتا آزاد
- 555 اثر رقم و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای لیلیوم با استفاده از ریزنمونه‌های TCL
احمد شریفی - فاطمه کیخا آخر - محبوبه یزدی - عبدالرضا باقری
- 565 تأثیر فور کلرفنورون بر پیازچه‌زایی، ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی موسیر (*Allium hirtifolium*)
نسرین فرهادی - سعیده علیزاده سالطه
- 577 اثر محلول پاشی برخی عناصر ریز مغذیدر قبل و بعد از گلدهی بر ویژگی‌های کمی و کیفی میوه انگور رقم "خوشناو"
زهرا داورخواه - بیژن کاوسی
- 590 تأثیر سطوح مختلف کم‌آبی بر برخی صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی
سید موسی موسوی - مهرانگیز چهارزی - اسمعیل خالقی

- 599 تعیین دماهای کاردینال چمن سردسیری و دو گونه علف هرز غالب آن
مرجان دیانت
- 611 بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی در باغات تجاری مشهد با نشانگر ISSR
شادی عطار - غلامحسین داوری‌نژاد - لیلا سمیعی - محمد مقدم
- 521 غربالگری هموکاریون‌ها و تولیدنژاد دورگ جدید قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) با استفاده از نشانگر ریزوماهواره
سیده مرضیه نوراشرف الدین - محمد فارسی - فرج اله شهرباری - جواد جانپور



ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های کلکسیون عناب ایران (*Ziziphus spp.*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

هاجر شایسته¹ - سعید ملک زاده سفارودی^{2*} - کمال غوث³ - فرج الله شهریاری⁴

تاریخ دریافت: 1392/08/28

تاریخ پذیرش: 1395/12/17

چکیده

عناب (*Zizyphus jujuba* Mill.) به عنوان یک میوه ارزشمند و مقاوم به شرایط مختلف آب و هوایی در بسیاری از مناطق ایران گسترش دارد. از عناب علاوه بر صادرات بعنوان گیاه دارویی نیز استفاده می‌شود لذا ارزش اقتصادی قابل توجهی دارد. ارزیابی تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و گام اولیه برای شناسایی و نگهداری ذخایر ژنتیکی و از اصول اولیه اصلاح گیاهان محسوب می‌شود. استفاده از نشانگرهای DNA از بهترین روش‌های موجود برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشند. در این بررسی از نشانگر ISSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی 31 اکوتیپ عناب جمع‌آوری شده از هشت استان عناب‌خیز کشور استفاده گردید. تعداد 13 آغازگر در واکنش PCR آزمایش شدند که شش آغازگر DNA الگو را بخوبی تکثیر و در بین نمونه‌ها چندشکلی را آشکار نمودند. از میان 84 مکان ژنی شناسایی شده، تعداد 70 مکان (83 درصد) چندشکلی نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و به روش UPGMA انجام گرفت. در تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌ها در سطح تشابه 0/85 در هفت گروه اصلی جای گرفتند. بیشترین تشابه ژنتیکی (0/95) بین نمونه‌های کلاله و درج و همچنین نוגاب و دوستیران و کمترین تشابه ژنتیکی (0/48) بین نمونه‌های برزادران و کنگان بدست آمد. آغازگرهای Y_{T8} (AC) و A_{8} (GA) مناسب‌ترین آغازگرها برای مطالعات بعدی تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع کل نمونه‌های کشور تقریباً در تنوع ناحیه خراسان جنوبی خلاصه شده است. همچنین در اکوتیپ‌های متعلق به استان‌های اصفهان و مازندران، سطح قابل ملاحظه‌ای از تنوع مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی ISSR، *Zizyphus jujuba*

مقدمه

عناب با نام علمی *Zizyphus jujuba* Mill. به خانواده *Rhamnaceae* تعلق دارد. این گیاه دارویی که در زبان فارسی به نام‌های تبرخون، شیلان، سنجد بلخ و سیب کوهی نیز خوانده می‌شود، از گذشته‌های بسیار دور کشت می‌شده و در آثار و فسیل‌های به جا مانده قدمت آن به بیش از 12 تا 14 میلیون سال پیش می‌رسد. درختی است بومی چین که حدود 7700 سال پیش در چین کاشت می‌شده است و به خرماي چینی معروف است. درخت عناب به حالت نیمه خودرو پرورش یافته و تا ارتفاع 2000 متری در نواحی شمالی

ایران، گرگان، گیلان، کاشمر (خانقاه، سیر)، بلوچستان، بندر عباس، کرمان، شیراز و اطراف سیستان و زابل می‌روید (5 و 23). در جدول 1 آمار سطح زیر کشت عناب در ایران بر اساس آمارگیری سال 1388 سازمان جهاد کشاورزی خراسان جنوبی نشان داده شده است (6). عناب به عنوان داروی تصفیه‌کننده خون، آرام‌کننده اعصاب، مقوی عمومی، مقوی معده، آرام‌بخش، ملین، ضدسرفه و مدر بکار می‌رود. بی‌خوابی را از بین برده و عرق شبانه را قطع می‌کند. برای ضعف عمومی و به طور کلی احساس خستگی و ضعف شدید بسیار نافع است. از برگ، ریشه و پوست درخت عناب برای قطع بعضی انواع تب، افزایش رشد موی سر و تهیه مایع شستشوی چشم استفاده می‌شود. عناب از داروهای ملین و نرم‌کننده سینه است (7). این گیاه از جمله درختان مقاومی است که قابلیت رشد و تولید در زمین‌های کم‌آب و شور را دارا می‌باشد و توجه بیشتر به آن ضمن بالا بردن ظرفیت تولید محصولات کشاورزی در حفاظت خاک نیز می‌تواند مؤثر باشد (5). در ایران تاکنون در خصوص تنوع موجود در نمونه‌های

1، 2 و 4- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(* - نویسنده مسئول: (Email: malekzadeh-s@um.ac.ir)

3 - کارشناس ارشد کشاورزی، جهاد کشاورزی استان خراسان جنوبی

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.27523

reticulatum را بررسی نمودند. آنها گزارش کردند که حتی با شش آغازگر چند شکل ISSR تخمین قابل اعتمادی از تنوع ژنتیکی قابل دستیابی است، در حالی که حدود 30 آغازگر جهت تخمین تنوع ژنتیکی با استفاده از RAPD مورد نیاز می‌باشد.

استفاده از نشانگر ISSR در تعیین روابط خویشاوندی گونه‌های مختلف جنس *Ziziphus* نیز با موفقیت همراه بوده است (14 و 20). به عنوان مثال فو و همکاران (3) ارتباط ژنتیکی بین 22 رقم از جنس *Ziziphus* شامل 19 رقم از ber، دو رقم از Chinese date و یک رقم از spine date با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD بررسی کردند. طبق آنالیز خوشه‌ای این 22 رقم در سه گروه با سطح شباهت ژنتیکی 0/845 قرار داده شد. اولین گروه شامل 16 واریته ber از تایوان، گروه دوم شامل سه رقم دیگر ber از ویتنام و گروه سوم شامل Chinese date و spine date بود. نتایج آنالیز خوشه‌ای کاملاً منطبق با ایدئولوژی سنتی در مورد طبقه‌بندی بود. در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی در میان 48 ژنوتیپ ber از مناطق مختلف جغرافیایی هند با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد مطالعه قرار گرفت. شباهت ژنتیکی در میان 48 ژنوتیپ ber در محدوده 47/62 درصد تا 88/97 درصد بود و پیشنهاد گردید که یک پایه ژنتیکی گسترده برای مجموعه ژرم پلاسم ber است. این مطالعه برتری سیستم مارکری ISSR نسبت به مارکر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در ber را نشان داد (21). لی و همکاران (10) با استفاده از روش ISSR تنوع ژنتیکی میان 117 نمونه عنب *Ziziphus jujuba* 'Huizao' که از نواحی مختلف جمع‌آوری شده بودند را ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت وجود دارد و بنابراین پتانسیل اصلاحی زیادی در این گونه وجود دارد. تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارتباط اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده عنب از مناطق مختلف ایران در کلکسیون عنب ایران (در خراسان جنوبی) با کمک نشانگر ISSR، به عنوان یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی به اجرا گذارده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از 31 اکوتیپ عنب که از میان هشت استان عنب‌خیز کشور شامل استان‌های لرستان، مازندران، گلستان، خراسان جنوبی و رضوی، اصفهان، فارس و قم جمع‌آوری شده بود، استفاده گردید. اکوتیپ‌های مذکور به همت کارشناس اداره جهاد کشاورزی شهرستان سربیشه آقای مهندس کمال غوث- در قالب کلکسیون در محل دشت خاران شهرستان سربیشه کاشته شده‌اند. نمونه‌برداری از برگ‌های جوان نهال‌ها صورت گرفت و سپس در دمای 20- سانتیگراد نگهداری شدند. منشأ و علامت اختصاری اکوتیپ‌های مورد استفاده در جدول 2 آمده است.

عنب اقدام چندان زیادی صورت نگرفته است. با این حال نتایج اولیه روی نمونه‌های جمع‌آوری شده اکوتیپ‌های موجود و ایجاد کلکسیون از برخی انواع عنب در ایران نشان می‌دهد که تنوع مورفولوژیکی زیادی در عنب وجود دارد.

دانش کافی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی و چگونگی استفاده بهینه از آن، از منافع بنیادین برای علوم پایه و برنامه‌های کاربردی مانند مدیریت مؤثر منابع ژنتیکی محصولات گیاهی است (11). جهت تعیین تنوع ژنتیکی و دسته‌بندی مواد ژنتیکی، بهترین روش استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد زیرا تعیین تنوع بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی با توجه به اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ بر فنوتیپ گیاهان، کارایی لازم را نخواهد داشت. نشانگرهای DNA به دو دسته مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم می‌شوند. از نشانگرهای معمول مبتنی بر PCR می‌توان ¹RAPD، ²AFLP و ³SSR را نام برد (17).

محدودیت‌های اصلی این روش‌ها تکرارپذیری کم RAPD، هزینه زیاد AFLP و نیاز به دانستن توالی‌های مجاور برای تولید آغازگرهای خاص هر گونه در مورد SSR می‌باشد. ISSR-PCR تکنیکی است که بر بیشتر این محدودیت‌ها غلبه کرده است (17). قطعات ISSR، توالی DNA به طول 100-3000 جفت باز می‌باشند که بین دو ناحیه ریزماهوراک⁴ که در جهت مخالف هم قرار گرفته‌اند، جای دارند. آغازگرهایی بر اساس ریزماهوراک طراحی و استفاده می‌شوند تا توالی DNA بین دو ISSR را تکثیر کنند (9). این آغازگرها شامل تکرارهایی دو، سه، چهار و یا پنج نوکلئوتیدی می‌باشند. همچنین آغازگرها می‌توانند قلاب نشده و یا معمولاً قلاب‌شده در انتهای 3' یا 5' بوسیله 1 تا 4 باز باشد. این تکنیک در مواردی چون بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعات فیلوژنی و تهیه نقشه ژنوم به کار می‌رود. مجموعه این ویژگی‌ها باعث شده که این روش کاربرد و اهمیت بالایی بویژه در مطالعه ژنوم‌های ناشناخته باشد (17).

نشانگر ISSR بطور موفقیت‌آمیزی برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در سطوح بین و درون گونه‌ای در مورد دامنه وسیعی از محصولات گیاهی استفاده شده است (4، 8 و 15). نوروزی و همکاران (12)، برای اولین بار از روش ISSR برای شناسایی رقم‌های پسته ایرانی، از 6 آغازگر استفاده کردند و نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی میان 31 رقم پسته مورد مطالعه وجود دارد و آنالیز ISSR-PCR چندشکلی کافی برای انگشت‌نگاری DNA در مقیاس بزرگ را تولید می‌کند. راثو و همکاران (16) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR روابط ژنتیکی بین 19 رقم نخود و جد وحشی *Cicer*

- 1- Random Amplified Polymorphic DNA
- 2- Amplified fragment length polymorphism
- 3- Simple Sequence Repeat
- 4- Microsatellite

جدول 1- آمار سطح زیر کشت عنب در ایران بر اساس آمارگیری سال 1388 سازمان جهاد کشاورزی خراسان جنوبی (6)

Table 1- Statistics of jujube cultivation in Iran based on the 1388 Census of Agricultural Organization of Southern Khorasan Province (6)

نام استان Name of Province	جمع کل Total (ha)	میزان کل تولید Total production (tonne)
خراسان جنوبی Southern Khorasan	1168	1702
خراسان رضوی Razavi Khorasan	31	9
اصفهان Isfahan	3	8
فارس Fars	6	15
کرمان Kerman	2	0.5
لرستان Lorestan	50	50
یزد Yazd	2	1
جمع کل Total	1260	1785.5

واحد آنزیم DNA تک‌پلیمرز (Fermentas) انجام شد. برای تکثیر قطعات DNA از دستگاه ترموسایکلر مدل Flex cycler (Biostep-آلمان) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با واسرشت‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه آغاز و با 35 چرخه شامل دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 45 ثانیه برای واسرشت‌سازی، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت 45 ثانیه با توجه به دمای اتصال آغازگرها مطابق جدول 3، گسترش رشته جدید به مدت 2 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد و گسترش نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه دنبال شد. از ژل آغاز 1/5 درصد برای مشاهده محصولات PCR استفاده شد. نمونه‌ها با ولتاژ ثابت 90 و به مدت 100 دقیقه الکتروفورز شدند. برای تخمین اندازه قطعات حاصل از واکنش PCR از نشانگر اندازه استفاده شد. پس از شستشوی ژل عکس‌برداری توسط نور UV صورت گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA ژنومی به روش CTAB بر اساس روش زنگ و همکاران (24) با اندکی تغییرات انجام شد. غلظت و کیفیت DNA بدست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز تعیین گردید و تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

آغازگرها: در این پژوهش از 13 آغازگر استفاده شد که اکثر آن‌ها بر اساس مطالعات لی و همکاران (10) انتخاب شدند. مشخصات آغازگرها در جدول 3 آمده است. از میان آغازگرهای استفاده شده، شش آغازگر که تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام داده و در بین نمونه‌ها چندشکلی مطلوبی نشان دادند، جهت آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: تکثیر قطعات DNA در یک واکنش با حجم نهایی 25 میکرولیتر، شامل 2/5 میکرولیتر بافر PCR (x 10)، 60 نانوگرم DNA ژنومی، 2/5 میلی‌مولار $MgCl_2$ ، 0/5 میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs - سیناژن)، 10 پیکومول آغازگر و یک

جدول 2- مشخصات اکوتیپ‌های عنب کلکسیون سربیشه

Table 2-Characteristics of sarbisheh jujube collection ecotypes

ردیف Number	محل جمع‌آوری Gathering place	کد Code
1	ساری-مازندران Sari- Mazandaran	Sari 8
2	کنگان سربیشه-خراسان جنوبی Kangan- Southern Khorasan	Kangan 9
3	نوغاب سربیشه-خراسان جنوبی Noghab Sarbisheh- Southern Khorasan	Noghab 10

4	القور بیرجند-خراسان جنوبی Ahghur- Southern Khorasan	Alghur 11
5	کالاله -گلستان Kalale- Southern Khorasan	Kalale 12
6	عربخانه نهپندان -خراسان جنوبی Arabkhane- Southern Khorasan	Arabkhane 14
7	نوغاب سریشه -خراسان جنوبی Noghab Sarbisheh- Southern Khorasan	Noghab 15
8	بردسکن -خراسان رضوی Bardaskan- Razavi Khorasan	Bardaskan 18
9	جویبار -مازندران Juibar- Mazandaran	Juibar 19
10	درج سریشه -خراسان جنوبی Doroh- Southern Khorasan	Doroh 20
11	کنگان سریشه -خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 21
12	درخش درمیان -خراسان جنوبی Derakhsh- Southern Khorasan	Derakhsh 22
13	تجنود قائن -خراسان جنوبی Tajnud Ghaen- Southern Khorasan	Tajnud 23
14	کوهپایه - اصفهان Kouhpayeh- Isfahan	Kouhpayeh 26
15	درج سریشه - خراسان جنوبی Doroh Sarbisheh- Southern Khorasan	Doroh 27
16	آسفیح سریشه - خراسان جنوبی Asphich Sarbisheh- Southern Khorasan	Asphich 28
17	کنگان سریشه - خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 29
18	قم Qom	Qom 30
19	گیوک بیرجند - خراسان جنوبی Giuk- Southern Khorasan	Giuk 31
20	درج سریشه -خراسان جنوبی Doroh Sarbisheh- Southern Khorasan	Doroh 32
21	الیگودرز - لرستان Aligoudarz- Lorestan	Aligoudarz 33
22	کلکستان نوغاب - خراسان جنوبی Kalkestan- Southern Khorasan	Kalkestan 34
23	خواف - خراسان جنوبی Khaf- Southern Khorasan	Khaf 35
24	بیاضیه - اصفهان Bayazieh- Isfahan	Bayazieh 36
25	کنگان سریشه -خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 38
26	برزادران بیرجند - خراسان جنوبی Borzaderan Birjand- Southern Khorasan	Borzaderan 39
27	کاشوک پائین - خراسان جنوبی Kashuk paeen- Southern Khorasan	Kashuk 40
28	اردستان - اصفهان Ardestan- Isfahan	Ardestan 41
29	برزادران بیرجند - خراسان جنوبی Borzaderan Birjand- Southern Khorasan	Borzaderan 42
30	دوستیران -فارس Doostiran- Fars	Doostiran 43
31	کنگان سریشه - خراسان جنوبی Kangan Sarbisheh- Southern Khorasan	Kangan 44

جدول 3- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده بر اساس مطالعات لی و همکاران

Table 3- Primers used for the ISSR analysis according to Lei et al.

ردیف Number	نام آغازگر Primer	فرمول توالی Sequence formula	توالی آغازگر (5'-3' primer sequence)	دمای اتصال Annealing temperature (C°)
1	UBC807	(AG) ₈ T	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT -3'	49
2	UBC808	(AG) ₈ C	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC -3'	49
3	UBC810	(GA) ₈ T	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT -3'	49
4	UBC811	(GA) ₈ C	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC -3'	49
5	UBC812	(GA) ₈ A	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAA -3'	49
6	UBC814	(CT) ₈ A	5'-CTCTCTCTCTCTCTA -3'	49
7	UBC815	(CT) ₈ G	5'-CTCTCTCTCTCTCTG -3'	49
8	UBC834	(AG) ₈ Y*T	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYT -3'	49
9	UBC840	(GA) ₈ YT	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT -3'	49
10	UBC841	(GA) ₈ YC	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYC -3'	49
11	UBC855	(AC) ₈ YT	5'-ACACACACACACACACYT -3'	49
12	UBC864	(ATG) ₆	5'-ATGATGATGATGATGATG -3'	45
13	UBC868	(GAA) ₆	5'-GAAGAAGAAGAAGAAGAA -3'	45

*Y= C و T

جدول 4- میزان چندشکلی ایجاد شده توسط آغازگرهای مورد استفاده ISSR

Table 4- Number of DNA polymorphic bands produced by ISSR primers

نام آغازگر primer	توالی sequence	تعداد کل باندها Total number of Bands	تعداد باندهای چندشکلی Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)
UBC855	(AC) ₈ YT	16	14	87.5
UBC811	(GA) ₈ C	10	8	80
UBC864	(ATG) ₆	15	13	86.6
UBC808	(AG) ₈ C	15	11	73.3
UBC812	(GA) ₈ A	12	11	91.6
UBC834	(AG) ₈ YT	16	13	81.2
Average		14	11.6	83.3

عنب، با استفاده از شش آغازگر، در مجموع 84 مکان قابل امتیازدهی ایجاد کرد که اندازه آنها در محدوده 200 تا 2000 جفت باز بود. در این بین 70 مکان (83 درصد) چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر 14 و میانگین تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر 11/6 بود. تعداد باند چندشکل مشاهده شده بوسیله این شش آغازگر در کلکسیون عنب ایران بین هشت تا 14 باند بود. بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگر UBC855 با 14 باند و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر UBC811 با هشت باند بود (جدول 4).

در مجموع 13 آغازگر مورد آزمایش به نظر می‌رسد آغازگرهای با تکرارهای دو نوکلئوتیدی نسبت به آغازگرهای با تکرارهای سه نوکلئوتیدی باندهای چندشکل بیشتری را تولید می‌کنند که به نظر می‌رسد این امر به دلیل فراوانی بیشتر توالی‌های حاوی تکرارهای دونوکلئوتیدی و قرارگیری آنها در ناحیه بین ژنی باشد. همچنین احتمال وقوع جهش در این توالی‌ها نسبت به نواحی کد کننده ژن

تحلیل داده‌ها: قطعات DNA تکثیر شده بر اساس همردیفی باندها به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) امتیازبندی شد. داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel، جهت تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم² UPGMA و ضریب دایس³ به نرم‌افزار NTSYSpc Ver 2.02 (18) وارد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین جهت تعیین میزان قرابت جمعیت‌ها با یکدیگر، از نرم‌افزار POPGEN3.2 (22) استفاده شد.

نتایج و بحث

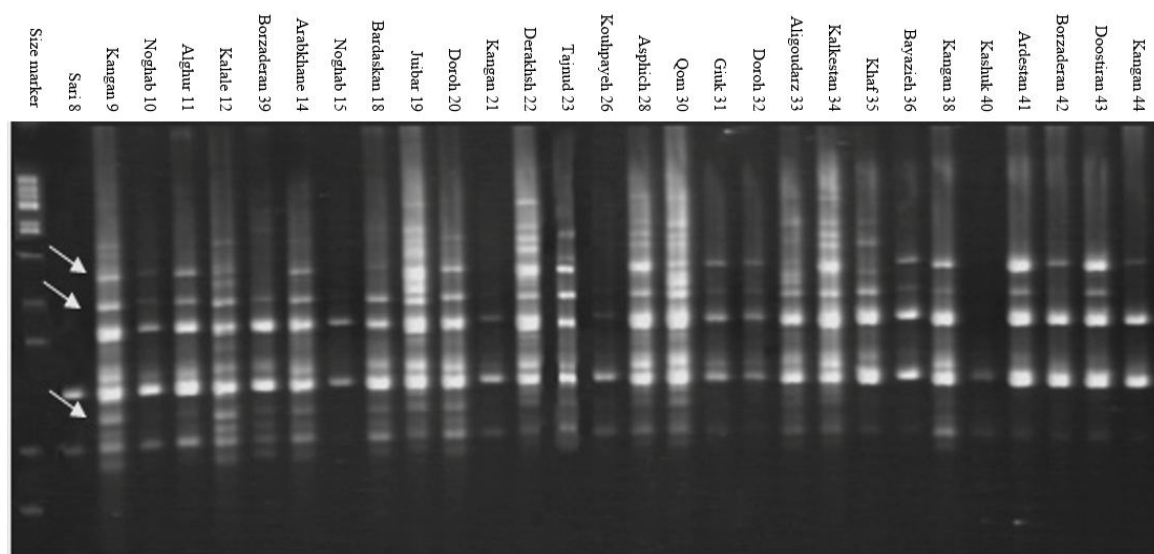
مشاهده الگوهای باندی ISSR: تجزیه ISSR در 31 نمونه

- 1- Cluster analysis
- 2- Unweighted Paired Group Method of Arithmetic averages
- 3- Dice coefficient

متعلق به گونه کشت شده از *Ziziphus mauritiana* و یک گونه وحشی از *Z. nummularia* میزان چندشکلی با استفاده از 18 آغازگر ISSR برابر 89 درصد بود. در بررسی لی و همکاران (10) نیز تعداد 10 آغازگر کارآمد از میان 70 آغازگر انتخاب شد. از میان 96 باند تکثیر شده 76 باند (79/17 درصد) چندشکلی داشتند و نتایج آن‌ها تنوع ژنتیکی بالایی را در میان 117 نمونه عناب نشان داد. بالا بودن درصد چندشکلی حاصل از شش آغازگر مورد بررسی در این تحقیق نیز نشان دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بود.

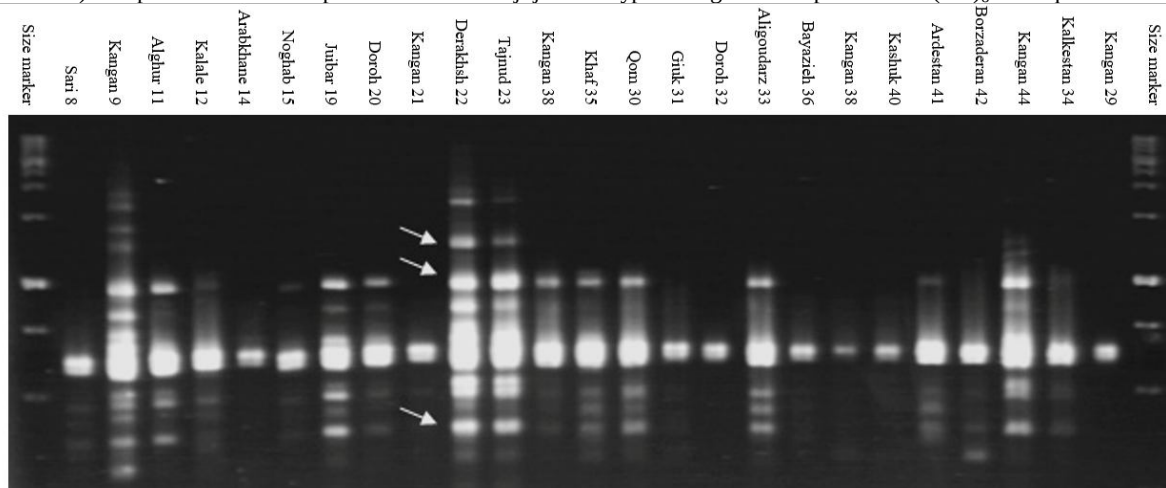
بیشتر است که سبب می‌شود تنوع در این نواحی بالاتر باشد. بلایر و همکاران (2) نیز بیان داشتند که معمولاً تکرارهای دونوکلئوتیدی که در انتهای 3' یا 5' مهار شده‌اند، چندشکلی بالاتری را آشکار می‌کنند. نمونه‌ای از باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای ISSR در شکل 1 نشان داده شده است.

مقایسه درصد باندهای چندشکل (83 درصد) در مطالعه حاضر با دیگر پژوهش‌های انجام گرفته در جنس *Ziziphus* نشان داد که چندشکلی بالایی با استفاده از آغازگرهای گزینش شده، ایجاد شده است. در مطالعه سینگ و همکاران (20) روی 47 ژنوتیپ از ber



الف) الگوی تکثیر DNA اکوتیپ‌های عناب با استفاده از آغازگر UBC855 با توالی (AC)₈YT

A) The pattern of DNA amplification bands in jujube ecotypes using UBC855 primer with (AC)₈YT sequence.



ب) الگوی تکثیر باند DNA اکوتیپ‌های عناب با استفاده از آغازگر UBC864 با توالی (ATG)₆

B) The pattern of DNA amplification bands in jujube ecotypes using UBC864 primer with (ATG)₆ sequence.

شکل 1- الگوی تکثیر نشانگر ISSR در اکوتیپ‌های عناب با استفاده از آغازگرهای الف: UBC855 و ب: UBC864. چند نمونه از باندهای چندشکل با پیکان نشان داده شده است

Figure 1- The pattern of DNA amplification bands in jujube ecotypes using A: UBC855 and B: UBC864. A few examples of polymorphic bands are shown by arrows

اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در دسته‌های مختلف طبقه‌بندی شده مشاهده می‌شود با اکوتیپ‌های سایر استان‌ها قرابت ژنتیکی مناسبی داشته است. این امر وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در خراسان جنوبی برای ژنوتیپ‌های مختلف این گیاه را تأیید کرد.

ب) تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگرهای با

تکرارهای دو نوکلئوتیدی: نتایج تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و با استفاده از پنج آغازگر با تکرارهای دونوکلئوتیدی نشان داد که در ضریب شباهت 0/82 می‌توان پنج گروه اصلی را مشخص کرد (شکل 3). جهت میسر شدن امکان مقایسه میان اشکال نامگذاری دسته‌ها با توجه به گروه‌بندی اکوتیپ‌ها در شکل 2 صورت گرفته است. دندروگرام حاصل از آغازگرهای با تکرارهای دو نوکلئوتیدی نیز حاکی از پراکنش اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در تمامی دسته‌ها بوده و نیز فاصله زیاد اکوتیپ‌های مازندران از یکدیگر و نیز اکوتیپ‌های اصفهان از هم در این گروه‌بندی مشاهده شد که از این لحاظ با نتایج حاصل از آغازگر (ATG)₆ هماهنگی نشان داد.

ج) تجزیه خوشه‌ای بر اساس تمامی آغازگرها: نتایج

تجزیه خوشه‌ای بر اساس شباهت ژنتیکی به روش UPGMA حاکی از وجود هفت گروه اصلی در ضریب شباهت 0/85 است (شکل 4). مطابق شکل گروه‌هایی که بیشترین تشابه را با دسته‌های بدست آمده از دندروگرام شکل 2 دارند، با حروف یکسان نشان داده شده‌اند. البته اکوتیپ‌های متعلق به دسته A در سایر گروه‌ها پراکنده شده‌اند و برخی اکوتیپ‌ها نیز به تنهایی در یک گروه قرار گرفته‌اند. نظری دقیق‌تر به شکل 4 نشان می‌دهد که اعضای مربوط به استان خراسان جنوبی در همه گروه‌ها یافت می‌شوند و در یک گروه جداگانه قرار نگرفته‌اند، بطوری که حتی نمونه‌های متعدد ناحیه کنگان سربیشه (خراسان جنوبی) در چهار دسته مجزا قرار دارند. این امر حاکی از تنوع قابل ملاحظه عنب حتی در منطقه محدودی نظیر سربیشه خراسان جنوبی است.

مقایسه نتایج آغازگرهای دوتایی و سه‌تایی ISSR با یکدیگر دسته‌بندی مناسب‌تر اکوتیپ‌ها را در گروه‌های منفک‌شده بر اساس آغازگر سه‌تایی بهتر از دسته‌بندی آغازگرهای دوتایی نشان می‌دهد. این امر تا حدودی حاکی از دقت بهتر این نوع آغازگر در تفکیک نمونه‌هاست که احتمالاً به ارتباط بیشتر این نوع توالی‌های SSR به نواحی کدکننده مربوط می‌شود. به همین دلیل توجه به نتایج تفکیک و دسته‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس آغازگر (ATG)₆ به عنوان مبنای تقسیم‌بندی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

بطور کلی مقایسه تجزیه خوشه‌ای حاصل از سه آنالیز انجام شده بر اساس آغازگرهای مختلف نشان داد که در تمام گروه‌ها، اکوتیپ‌های متعلق به خراسان جنوبی حضور دارند.

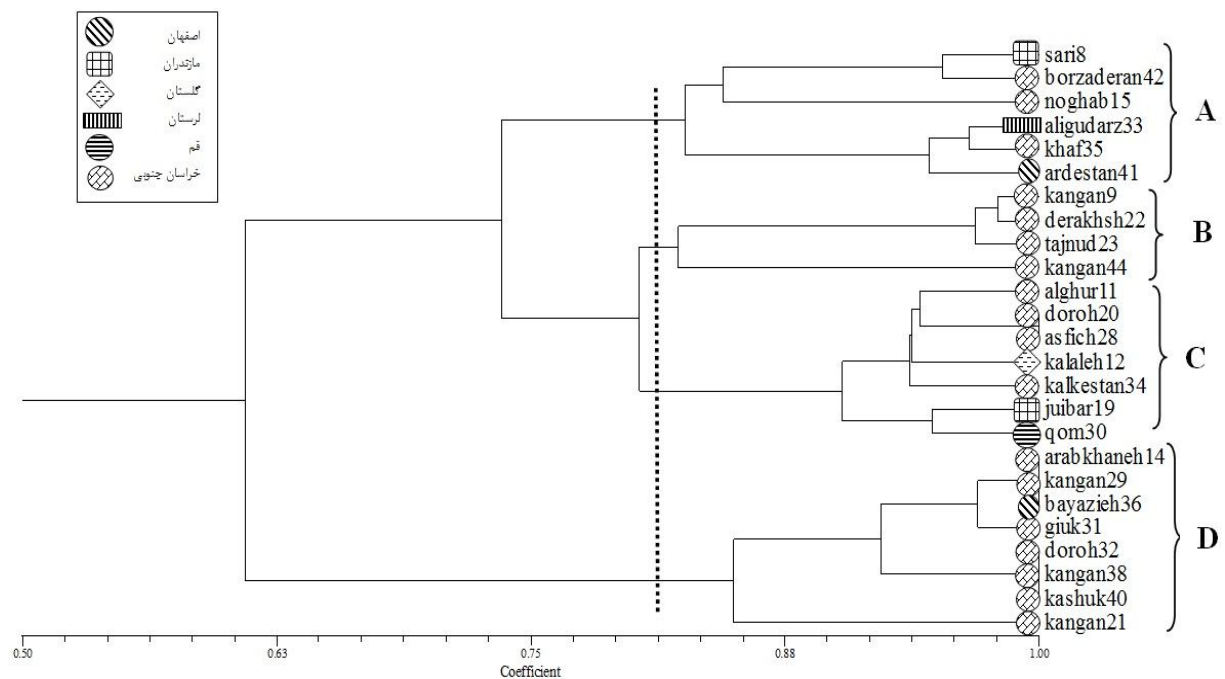
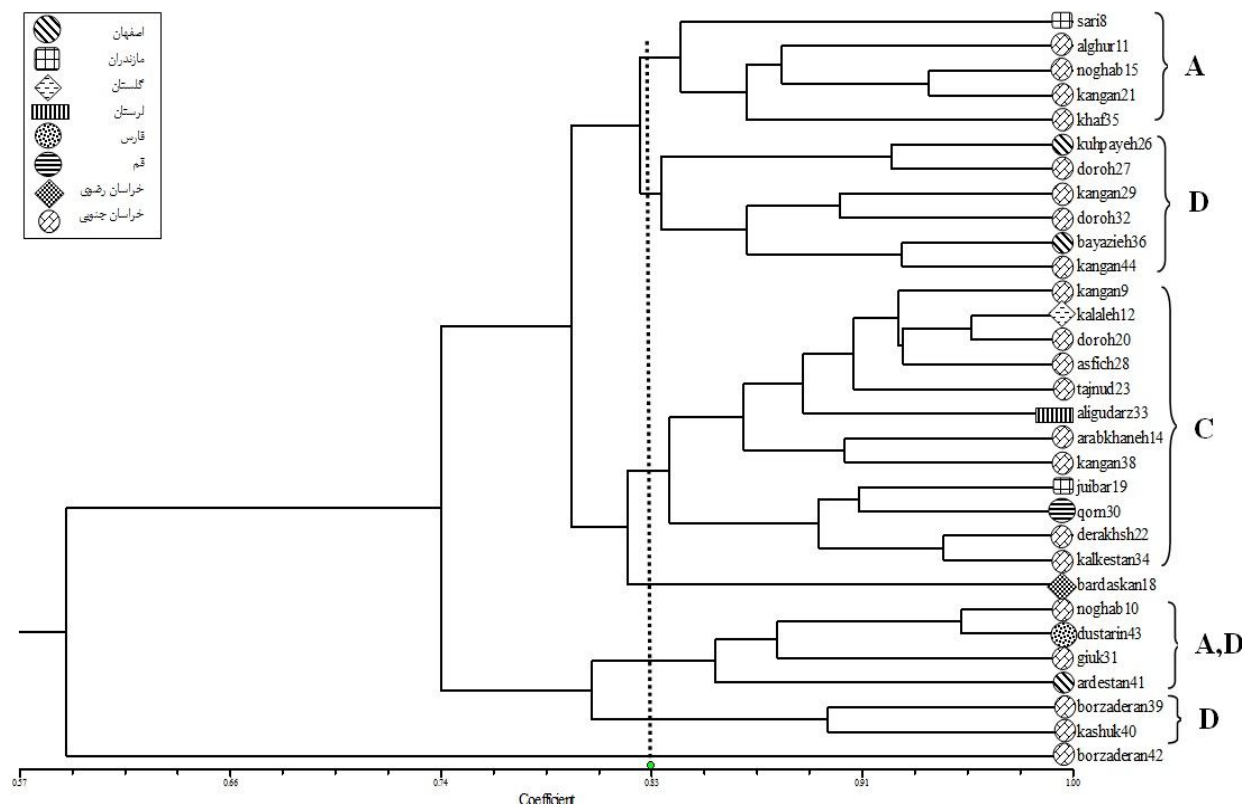
بر اساس داده‌های بدست آمده از تمامی آغازگرها، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین 0/48 تا 0/95 متغیر بود و میانگین شباهت ژنتیکی بین تمام جفت نمونه‌ها 0/75 محاسبه گردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تنوع ژنتیکی مناسبی جهت انجام برنامه‌های اصلاحی بر روی عنب وجود دارد. در مطالعه‌ای که توسط سینگ و همکاران (20) در هند روی جنس *Ziziphus* انجام شد، میزان شباهت ژنتیکی از 43/07 تا 90/30 درصد متغیر بود. آنان نتیجه‌گیری کردند که ژنوتیپ‌های مورد استفاده، واگرا و منشعب هستند. در مطالعه حاضر جفت نمونه‌های نוגاب (noghab10) و دوستیران (dustarin43) و همچنین کلاله (kalaleh12) و درح (doroh20) بیشترین تشابه ژنتیکی را نسبت به هم (0/95) داشتند و نمونه‌های کنگان (kangan9) و برزادران (borzaderan42) در دورترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم (0/48) قرار گرفتند.

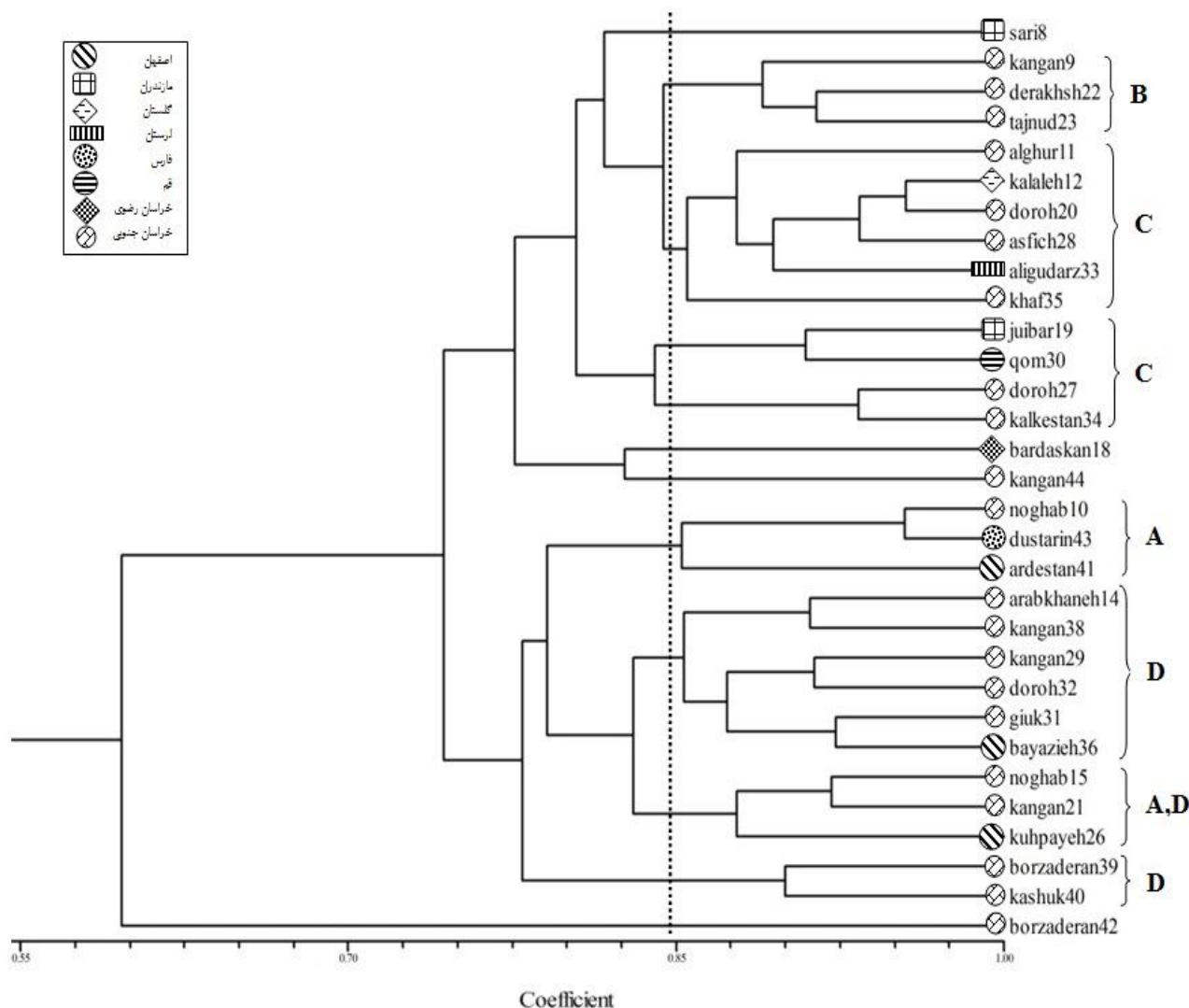
آنالیز مولکولی اکوتیپ‌های مورد بررسی

با توجه به احتمال بیشتر قرارگیری توالی‌های با تکرارهای سه نوکلئوتیدی در مناطق کدکننده ژن و حضور توالی‌های با تکرارهای دو نوکلئوتیدی در نواحی بین ژنی انتظار می‌رود توانایی آن‌ها در تفکیک اکوتیپ‌ها متفاوت باشد. لذا در این مطالعه سه آنالیز جداگانه بر اساس داده‌های حاصل از (الف) آغازگر با سه نوکلئوتید تکراری، (ب) آغازگرهای با دو نوکلئوتید تکراری و (ج) تمامی آغازگرها صورت گرفت.

الف) تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگر با تکرارهای

سه نوکلئوتیدی: پیش از بیان نتایج حاصل، لازم به ذکر است که شش اکوتیپ از مجموع 31 اکوتیپ موجود، هیچ باندی را با استفاده از این آغازگر تولید نکردند. در نتیجه آنالیز روی 25 اکوتیپ باقیمانده صورت گرفت. دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA در ضریب شباهت 0/82، چهار گروه اصلی (clade) را در بین نمونه‌های عنب مشخص کرد (شکل 2). گروه A شامل سه اکوتیپ از خراسان جنوبی و یک اکوتیپ از هر یک از استان‌های اصفهان، مازندران و لرستان بود. گروه B تنها شامل چهار اکوتیپ خراسان جنوبی و گروه C شامل چهار اکوتیپ دیگر از خراسان جنوبی و یک اکوتیپ از هر یک از استان‌های گلستان، مازندران و قم بود. در گروه D نیز هفت اکوتیپ از خراسان جنوبی به همراه یک اکوتیپ از استان اصفهان قرار گرفتند. بطور کلی می‌توان گفت نمونه‌های خراسان جنوبی در تمامی گروه‌ها حضور داشتند. همچنین نمونه‌های اصفهان در دو گروه جدا از هم و نمونه‌های مازندران نیز در دو دسته دور از هم مشاهده شدند. گروه‌های چهارگانه قابل تفکیک در این آنالیز که احتمال می‌رود مربوط به بخش‌های کدکننده ژنی باشند با حروف A، B، C و D در شکل 2 نشان داده شده‌اند. به نظر می‌رسد آنچه از

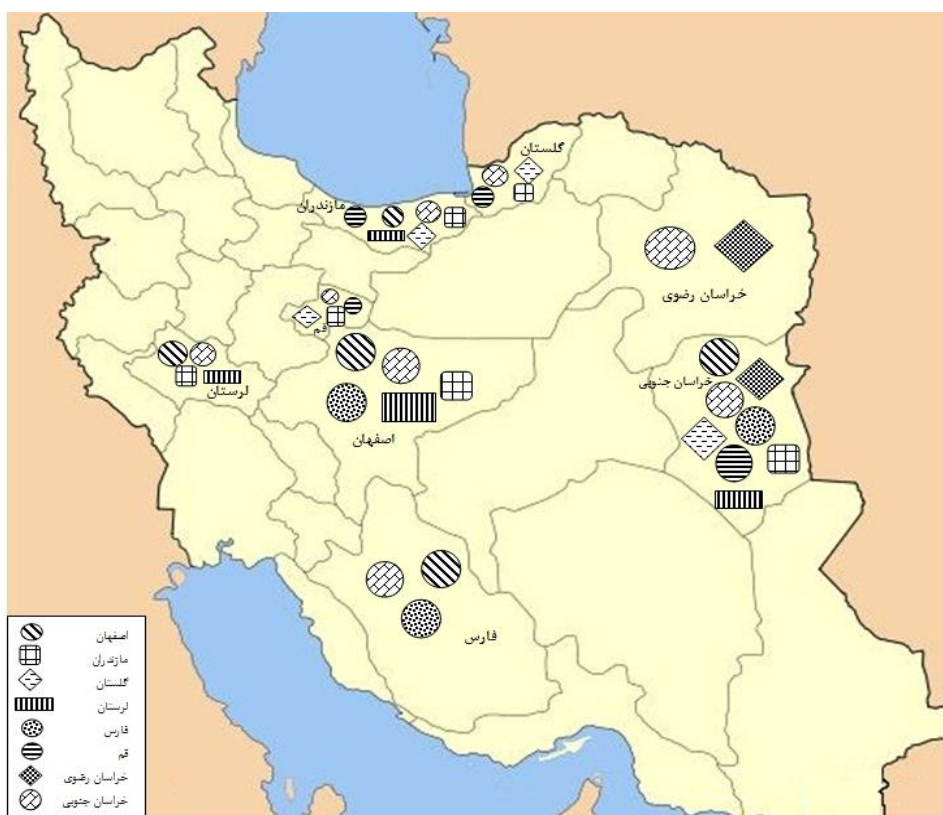




شکل 4- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای 31 اکوتیپ عنب ایران بر اساس 6 آغازگر آزمون شده
Figure 4-UPGMA dendrogram based on six used primers for Iranian jujube ecotypes

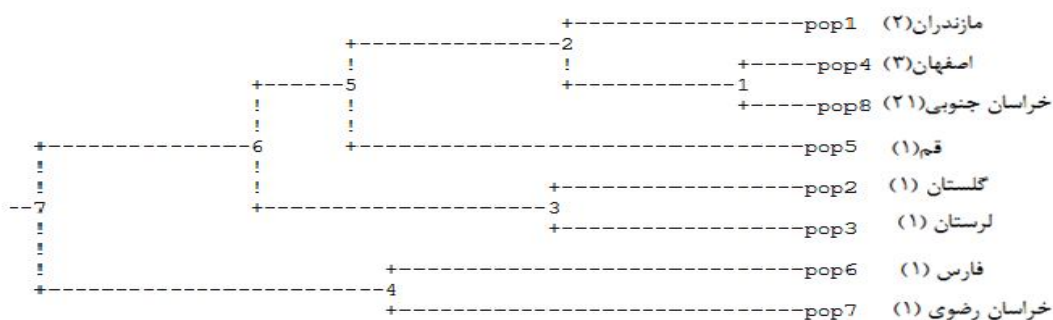
برخوردار است. این فرضیه در مورد اکوتیپ‌های استان مازندران نیز صادق است زیرا نمونه‌های این استان نیز در دو دسته مجزا قرار گرفتند. نتایج این پژوهش با نتایج شاه‌حسینی و همکاران (19) که از 15 آغازگر AFLP برای بررسی ژنتیکی 29 ژنوتیپ عنب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور استفاده نمودند، تا حدود زیادی مطابقت داشت. آنها نیز نشان دادند که سه گروه خراسان، اصفهان و قم بطور کاملاً مجزا تفکیک شده‌اند و می‌توان (این مناطق) نواحی مرکزی را با اطمینان بالا به عنوان یکی از خاستگاه‌های عنب معرفی نمود. در شکل 5 نحوه پراکنش اکوتیپ‌های عنب در هشت استان کشور با توجه به آنچه در نتایج آنالیز تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های مختلف بدست آمده، مشخص شده است. مطابق این شکل اهمیت مراکز هسته‌ای تنوع در استان‌های ذکر شده، نشان داده شده است.

نتایج حاکیست تنوع کل نمونه‌های مناطق مختلف، تقریباً در تنوع ناحیه خراسان جنوبی خلاصه شده است. با توجه به اینکه خراسان جنوبی از دیرباز محل کشت این گیاه دارویی بوده، احتمالاً یکی از مراکز و هسته‌های مهم تنوع عنب، این منطقه به حساب می‌آید (5). خاکدامن و همکاران (7) نیز با بررسی‌های مورفولوژیک روی این گیاه، به این نتیجه رسیدند که گروه خراسانی یکی از مبادی اصلی و مرکز تنوع در میان اکوتیپ‌هاست. عباسی و همکاران (1) نیز در تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های عنب جمع‌آوری شده در کلکسیون سربیشه با استفاده از نشانگر RAPD نشان دادند که گروه خراسانی یکی از منشأهای اصلی عنب در ایران است و از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشد. بعلاوه از آنجا که نمونه‌های استان اصفهان در هر سه دندروگرام ترسیم شده در گروه‌های جدا از هم قرار گرفته‌اند، می‌توان گفت که این استان نیز از تنوع ژنتیکی مناسبی



شکل 5- نحوه پراکنش اکوتیپ‌های عناب در هشت منطقه جغرافیایی ایران. این شکل بر اساس حضور اکوتیپ‌های مناطق مختلف در دسته‌های جداگانه مطابق شکل‌های 2 و 4 ترسیم شده است. اکوتیپ‌های یک استان خاص که با اکوتیپ‌های دیگر استان‌ها در یک دسته مشترک قرار گرفته‌اند، در هر یک از مناطق هشت‌گانه در کنار هم نشان داده شده‌اند

Figure 5- Distribution of jujube ecotypes into eight geographic regions of Iran. This figure is drawn based on ecotypes of different areas in separated categories according to Figures 2 and 4. Ecotypes of a particular province were with other province ecotypes in a common category have been shown together in each of the eight regions



شکل 6- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار POPGEN3.2 برای هشت جمعیت جغرافیایی در کلکسیون عناب ایران بر اساس داده‌های بدست آمده از تمامی آغازگرها

Figure 6- Dendrogram of POPGEN3.2 software for eight geographic populations in jujube collection based on the data from all Primers

عناب ایران، ماتریس شباهت با استفاده از ضریب نی (13) و توسط نرم‌افزار POPGEN3.2 تعیین شد و دندروگرام حاصل از آن ترسیم

آنالیز مولکولی جمعیت‌های عناب ایران: به منظور محاسبه میزان تنوع ژنتیکی بین 8 جمعیت جغرافیایی از اکوتیپ‌های

تفاوت چندانی از لحاظ ایجاد چندشکلی با کمک نشانگر کارآمد ISSR نداشته است. این در حالی است که به نظر می‌رسد اکوتیپ‌های استان فارس و باریکه شمالی کشور به دلیل اختلافات ژنتیکی جدی‌تر، هسته تنوع متفاوت‌تری را نسبت به تنوع نسبتاً گسترده مشاهده شده در خراسان جنوبی داشته‌اند.

گردید (شکل 6). بر اساس داده‌های بدست آمده از تمامی آغازگرها، تشابه ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بین 0/47 تا 0/95 متغیر بود. دو جمعیت اصفهان و خراسان جنوبی کمترین اختلاف و جمعیت‌های اصفهان و خراسان رضوی بیشترین اختلاف را نشان دادند. این امر حاکی از تنوع ژنتیکی نزدیک جمعیت اصفهان به تنوع موجود در خراسان جنوبی است و ظاهراً زمینه ژنتیکی بررسی شده در آن‌ها

منابع

- 1- Abbasi S., Malekzadeh Shafaroudi S., Ghooth K., and Shahriari F. 2012. Analysis of genetic diversity in Iranian Onnab ecotypes (*Ziziphus* spp.) using RAPD molecular Marker. Iranian Journal of Field Crops Research, 10(3):583-590. (in Persian)
- 2- Blair M.W., Panaud O., and McCouch S.R. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). Theoretical and Applied Genetics, 98: 780-792.
- 3- Fu J.X., Liu C.M., and Xie J.H. 2007. Identification and classification of ber cultivars based on ISSR and RAPD analysis. Acta horticulturae, 764:119-126.
- 4-Goulao L. and Oliveira C.M. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica, 122:81-89.
- 5- Ghouth K. 2010. Jujube Forgotten Fruit. Agricultural Organization of Southern Khorasan Province. (in Persian)
- 6- Ghouth K., and Malekzadeh Shafaroudi S. 2011. Identification Book of Iranian Collection of Jujube Ecotypes. Agricultural Organization of Southern Khorasan Province. (in Persian)
- 7- Khakdaman H., Pourmeidani A., and Adnani M. 2007. Study of genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) ecotypes. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14(4):202-214. (In Persian with English abstract)
- 8- Koohi dehkordi M., Rahimmalek M., Sayed Tabatabae B., Baninasab B., and Mobli M. 2006. Assessment of Genetic Relationship among some of the Iranian and Foreign Olive Cultivars using ISSR Markers. Journal of Horticultural Science and Technology, 7(2):93-102. (in Persian)
- 9- Kumar P., Gupta V.K., Misra A.K., Modi D. R., and Pandey B. K. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. Plant Omics Journal, 2:141-162.
- 10- Li J.D., Bi H.T., Li H.T., Li Z.S., and Fenga, J.C. 2009. Genetic Analysis of *Ziziphus jujuba* 'Huizao' Using ISSR Markers. Acta horticulturae, 840:135-142
- 11-Mondini L., Noorani A., and Mario Pagnotta A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity, 1:19-35.
- 12-Noroozi S., Baghizadeh A., and Javaran M. 2009. The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. Biological Diversity and Conservation, 2(2):50-56
- 13-Nei M., and Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the Natural Academy of Science of the U.S.A, 76:5269-5273
- 14-Obeed R.S., Harhash A.L., and Abdel-Mawgood A.L. 2008. Fruit properties and genetic diversity of five ber (*Ziziphus mauritiana* Lam) cultivars. Pakistan Journal of Biological Science, 11:888-893
- 15 -Okun D.O., Kenya E.U., Oballa P.O., Odee D.W., and Muluvi, G.M. 2008. Analysis of genetic diversity in *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) seed sources using inter simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. African Journal of Biotechnolog, 7:2119-2123
- 16- Rao L.S., Usha-Rani P., Deshmukh P.S., Kumar P.A., and Panguluri S.K. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetic Resources and Crop Evolution, 54:1235-1244.
- 17- Reddy M.P., Sarla N., and Siddiq E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128:9-17.
- 18- Rohlf F.J. 1997. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. Exeter Publications, N.Y.
- 19- Shakhoseini R., Babaei A., Kazemi M., and Omidbaigi R. 2012. A study on genetic variation in Iranian Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) genotypes using molecular AFLP marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(1):55-68
- 20-Sing A.K., Devanshi L., Sharma P., Singh R., Singh B., Koundal K.R., and Singh N.K. 2007. Assessment of genetic

- diversity in *Ziziphus mauritiana* using inter-simple sequence repeat markers. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 16:35-40.
- 21-Singh A.K., Singh R., and Singh N.K. 2009. Comparative evaluation of genetic relationships among ber (*Ziziphus* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 69(1): 106-118.
- 22-Yeh F.C., Yang R-C., Boyle T.B.J., Ye Z-H., and Mao J.X. 1999. POPGENE the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- 23- Zargari A. 1992. Medical Plants. First volume. University of Tehran Press. (in Persian)
- 24- Zeng J., Zou Y.P., Bai J.Y., and Zheng, H.S. 2002. Preparation of total DNA from recalcitrant plant taxa. Acta Botanica Sinica, 44:694-697.



Evaluation of Genetic Diversity in Collection from Iranian Jujube Ecotypes (*Ziziphus* spp.) using ISSR-molecular Marker

H. Shayesteh¹- S. Malekzadeh Shafaroudi^{2*}- K. Ghouth³ - F. Shahriari⁴

Received: 19-11-2013

Accepted: 07-03-2017

Introduction: Jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) as a valuable medicinal plant and adapted to different climatic conditions is widespread in many parts of Iran. Nowadays, beside the export of its fruit, jujube is also used as an herbal medicine to treat the diseases, so it has a high economic value. Study on genetic diversity is the first step to identify and preservation of germplasm. It is also considered as the basic principles of plant breeding. DNA markers seem to be the best way in determination of the genetic diversity. Inter simple sequence repeats (ISSR) markers are highly polymorphic and combine most benefits of Simple Sequence Repeats (SSRs) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) to the generality of random amplified polymorphic DNA (RAPD).

Materials and Methods: In order to study of the genetic diversity among 31 ecotypes collected from eight Jujube-rich provinces, including South Khorasan, Razavi Khorasan, Mazandaran, Golestan, Qom, Isfahan, Lorestan and Fars. Genomic DNA was extracted by CTAB method and polymerase chain reaction (PCR) was performed with 13 ISSR primers in which six most efficient primers were selected. Cluster analysis based on Dice similarity coefficient and Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) was carried out and POPGENe.3.2 software was used to determine the similarity of populations with each other.

Results and Discussion: 84 loci were amplified and 70 of them (83%) revealed a proper polymorphism with the size between 200 and 2000 base pair. The average number of amplified and polymorphic bands per primer was 14 and 11.6 respectively. Primers with di-nucleotide repeats produced more polymorphic bands than ones with tri-nucleotide repeats. It seems that this is due to a higher frequency of sequences containing di-nucleotide repeats in intergenic regions and higher possibility of mutation revealed in more diversity in comparison to gene coding regions. Anchored primers with 1 or 2 nucleotides at the 5' end make sure annealing only to the ends of SSRs in template DNA, so avoiding internal priming and smear formation. In addition, the anchor lets only a subset of the microsatellites to serve as priming sites. Primers (AC)₈YT and (GA)₈A with the higher percentage of polymorphism is recommended for further analysis. According to the cluster analysis, the ecotypes could be classified into seven main groups at the 0.85 level of genetic similarity. The most genetic similarity (0.95) was observed between ecotypes from Kalaleh and Doroh and also Noghab and Dustiran and the least genetic similarity (0.48) observed between Kangan and Borzaderan. POPGENe.3.2 software data indicated that populations of Isfahan and South Khorasan had the slightest difference while populations of Isfahan and Razavi Khorasan showed the most difference.

Conclusions: In general results demonstrated that the total diversity of jujube ecotypes in Iran is summarized in the area of South Khorasan province. Given data showed that South Khorasan has been an original place of cultivation of this medicinal plant, this area could be considered as one of the important centers of jujube diversity. In addition, significant levels of diversity were observed among ecotypes belonging to Isfahan and Mazandaran provinces.

Keywords: Genetic diversity, ISSR marker, *Zizyphus jujuba*

1, 2 and 4- Ph.D. Student, Associate Professor and Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(*- Corresponding Author Email: malekzadeh-s@um.ac.ir)

3- Master of Science in Agriculture, Jahad-e-Keshavarzi Institute of Southern Khorasan



بهینه‌سازی عوامل موثر در ازدیاد درون شیشه‌ای پایه میروبالان 29c

زهره شعبانی¹ - بهرام عابدی^{2*} - ابراهیم گنجی مقدم³ - علی تهرانی فر⁴

تاریخ دریافت: 1393/02/14

تاریخ پذیرش: 1396/02/31

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری میروبالان 29C انجام شد. در این مطالعه از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار و هر تکرار شامل 5 نمونه استفاده شد. به منظور ضد عفونی نمونه های گیاهی از 2 تیمار، شامل اتانول 70 درصد در 1 دقیقه و هیپوکلریت سدیم 10 درصد در 10 دقیقه استفاده شد. نتایج نشان داد هیپوکلریت سدیم 10 درصد به مدت 10 دقیقه، با 4 درصد آلودگی ریز نمونه های سال جاری بهترین تیمار ضد عفونی بود. از دو نوع محیط کشت شامل MS و DKW و تنظیم کننده رشد بنزیل آمینوپورین در غلظت های 0، 1، 2، 3 و 4 میلی گرم در لیتر در مرحله پرآوری و ایندول بوتیریک اسید در غلظت های 0، 1، 2 و 3 میلی گرم در لیتر در مرحله ریشه زایی استفاده شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین با میانگین پرآوری 6/16 شاخساره، و طول 2/51 سانتی متر بیش ترین شاخه زایی و بیش ترین درصد ریشه زایی در محیط MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر IBA و طول ریشه به میزان 100 درصد و 6/75 سانتی متر، به دست آمد. سازگاری گیاهچه ها به شرایط گلخانه ای با استفاده از سیستم مه افشانی، با موفقیت انجام شد بالاترین درصد بقای گیاهچه (70/0 درصد) در محیط کوکوپیت و پرلایت (1:1 حجمی) به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریشه زایی، سازگاری، ضد عفونی

مقدمه

رشد زیاد، و قدرت استقرار بهتر اشاره کرد، که به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرند. با تحقیقات بیشتر در آمریکا، سه کلون از میروبالان شناسایی شده است، که خصوصیات این کلون ها تا حدودی متفاوت می باشد ولی تمامی آن ها پایه های قوی رشد می باشند. یکی از این کلون ها Myrobalan 29c است که مقاوم به نماتد ریشه، مقاوم به پوسیدگی ریشه بلوط و از قدرت رشد بالایی برخوردار است. بیشترین محدودیت پایه Myrobalan 29c استقرار ضعیف آن می باشد، اما به دلیل ویژگی قدرت القای رشد، بیشتر از کلون های دیگر استفاده می شود (6). یکی از ملزومات کشت بافت، آشنایی با رفتارهای فیزیولوژیکی و حساسیت گونه های گیاهی به آلودگی پاتوژن های مختلف می باشد. مواد مختلفی از جمله هیپوکلریت سدیم تجاری (10-50٪)، اتانول 70 درصد و کلرید جیوه در غلظت های متفاوت و مدت زمان تیمار از چند ثانیه تا چندین دقیقه با توجه به بافت گیاهی به منظور ضد عفونی سطحی و استقرار ریزنمونه‌ها تاکنون مورد بررسی قرار گرفته اند (1). کمالی و همکاران در سال 1380 گزارش کردند بهترین روش گندزدایی برای دو رگه هلو × بادام (GF677) استفاده از کلرید جیوه 0/1 درصد به مدت 6 دقیقه می باشد. و محیط کشت DKW همراه با 0/5 میلی گرم در لیتر بنزیل

با توجه به نقش پایه های درختی در میزان رشد رویشی، زود رسی، میزان عملکرد و مقاومت در برابر بیماری ها، پایه مناسب نقش بسزایی در برنامه مدیریت باغ خواهد داشت، بطور کلی پایه های درختان میوه به دو روش جنسی و غیر جنسی تکثیر می شوند، ولی با توجه به اینکه در تکثیر جنسی تفرق صفات حاصل شده و نهال های حاصله از نظر خصوصیات ژنتیکی تغییر می یابند، از چند دهه پیش سعی بر این است تا از روش تکثیر غیر جنسی، به ویژه روش های کشت بافت برای تولید انبوه پایه های سالم و توسعه باغات میوه استفاده شود (5). پایه های بذری میروبالان از گذشته تا به حال مورد استفاده بوده است. از ویژگی های مثبت این پایه می توان به سهولت دسترسی، ارزان بودن، محصول دهی خوب پس از بلوغ، مقاومت نسبی به خشکی، مقاومت نسبی به بیماری پوسیدگی ریشه، قدرت

1، 2 و 4- به ترتیب دانشجوی ارشد، استادیار و استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(Email: abedy@um.ac.ir

*) نویسنده مسئول:

3- دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.33469

درجه ی سانتیگراد با فتوپریود 16 ساعت روشنائی و 8 ساعت تاریکی منتقل شدند. هر تیمار ضدعفونی شامل سه تکرار و هر تکرار شامل پنج ریز نمونه می باشد. پس از گذشت دو هفته، درصد آلودگی و درصد ریز نمونه های فعال یادداشت برداری و مورد ارزیابی قرار گرفت. برای کشت ریزنمونه ها از محیط کشت پایه ی MS در حالت جامد و تکمیل شده با 3٪ ساکارز و 7 گرم در لیتر آگار استفاده شد. pH محیط کشت به اندازه 5/7 تنظیم شد.

آزمایش دوم - مرحله پرآوری (شاخه زایی)

در این مرحله هدف، شناسایی تیمارهایی است که در مقایسه با سایر تیمارها براساس فاکتورهای شاخه زایی برتر هستند. تیمارهای مورد بررسی عبارتند از: محیط کشت در دو سطح (MS، DKW) و غلظت بنزیل آمینوپورین در پنج سطح، (0، 1، 2، 3، 4 میلی گرم برلیتر) به محیط کشت اضافه شد. ریز نمونه های بعد از کشت به اتاقک رشد با دمای روز 22 درجه سانتیگراد و دمای شب 16 درجه سانتیگراد با فتوپریود 16 ساعت روشنائی و 8 ساعت تاریکی با میزان نور 2000 تا 2500 لوکس انتقال داده شدند. در این مرحله از آزمایش فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل پنج نمونه استفاده شد. عامل اول نوع محیط کشت در دو سطح (MS و DKW) و عامل دوم غلظت بنزیل آمینوپورین در پنج سطح، (0، 1، 2، 3، 4 میلی گرم برلیتر) بود. که بعد از 3 بار واکشت به فواصل هر 3 هفته، تعداد، طول و کیفیت شاخه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش، کیفیت ریز نمونه در سه سطح A (ریز نمونه های قوی و پر رشد: فاقد نشانه های شیشه ای شدن، نکروزه شدن مرستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند)، B (ریز نمونه های متوسط رشد: کم تر از 15 درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مرستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) و C (ریزنمونه ها ضعیف رشد: 15 تا 30 درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مرستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) اندازه گیری شدند.

آزمایش سوم - ریشه زایی

در این مرحله شاخساره های به طول 2-1 سانتی متر انتخاب، و به محیط کشت ریشه زایی منتقل شدند. در این مرحله نوع محیط کشت در دو سطح (MS و DKW)، غلظت اسید ایندول بوتیریک در چهار سطح (0، 1، 2، 3 میلی گرم درلیتر)، مورد بررسی قرار گرفت. پس از ریشه دار شدن ریز نمونه ها برای تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده های رشد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه، تعداد برگ و طول ساقه و کیفیت ریز نمونه با درجه بندی در سه سطح A (ریزنمونه های قوی و پر رشد: فاقد نشانه های شیشه ای شدن، نکروز

آذین با ضریب تکثیری حدود 6/06 شاخساره جدید به اژه هر ریز نمونه اولیه بهترین محیط برای پرآوری این پایه بود (10). در مطالعه تاثیر NAA و BAP بر پرآوری پایه ی گزیلا 5 بیشترین تعداد ساقه در تیمار حاوی 1 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین مشاهده شد (21). و همچنین پایه میروبالان در محیط کشت MS با غلظت 1 و 0/5 میلی گرم در لیتر بنزیل آذین و 1 میلی گرم در لیتر جبرلین بیشترین پرآوری، و غلظت 0/1 گرم در لیتر اسید ایندول بوتیریک بیشترین ریشه زایی را داشته اند (13 و 14). در بررسی پلاپ، پایه پاکوتاه آلو در محیط کشت MS 1/2 بالاترین درصد ریشه زایی را نشان داد (18). یانگ نیگ در بررسی ریزازدیادی آلو چینی در شرایط درون شیشه ای نشان داد که ریشه زایی در محیط کشت MS 1/2 بالاترین مقدار بوده، و سازگار کردن گیاهچه های ریشه دار شده به شرایط گلخانه ای با استفاده از سیستم مه افشانی با موفقیت انجام شد (23). ذوالفقاری نسب و همکاران پژوهشی در رابطه با کشت درون شیشه ای بروی دو رگه های طبیعی زردآلو × گوجه انجام دادند. نتایج نشان داد سازگار کردن شاخساره های ریشه دار به شرایط گلخانه ای با استفاده از سیستم مه افشانی، با موفقیت (3/64٪) انجام شد (25). با توجه به اهمیت این پایه و لزوم تکثیر انبوه آن در کشور، لذا این مطالعه با هدف تعیین بهترین روش ضدعفونی، ارزیابی توانایی تکثیر درون شیشه ای و گزینش مناسب ترین محیط کشت با نسبت هورمونی مناسب برای ریز افزایشی پایه میروبالان 29c (Myrobalan 29c) اجرا گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، در قالب چهار آزمایش جداگانه به شرح زیر اجرا شد.

آزمایش اول - ضدعفونی و استقرار ریزنمونه ها

تهیه ی مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش، شاخه های پایه میروبالان 29c که از خزانه مرکز تحقیقات کشاورزی اواخر خرداد ماه 1392 جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا به دو گروه (شاخه سال جاری و شاخه یکساله) تقسیم و سپس هر گروه از ریز نمونه ها حدود 20 دقیقه زیر آب جاری شستشو داده شد. در مرحله بعد نسبت به اعمال تیمار ضدعفونی در اتاقک استریل (هود لامینار) اقدام شد. (الکل 70 درصد به مدت 1 دقیقه و هیپو کلریت سدیم 10 درصد به مدت 10) بعد از هریک از مراحل فوق 3 بار عمل آبکشی نمونه ها با آب مقطر سترون انجام شد. پس از اعمال تیمارها، نمونه ها در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده رشد کشت شده و به اتاقک رشد با میانگین دمای روز 22 درجه ی سانتیگراد و دمای شب 16

شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند)، B (ریز نمونه های متوسط رشد: کم تر از 15 درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) و C (ریز نمونه های ضعیف رشد: 15 تا 30 درصد نمونه ها دارای نشانه های شیشه ای شدن، نکروز شدن مریستم انتهایی و زرد شدن برگ هستند) اندازه گیری شدند. جهت آنالیز آماری از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل سه ریز نمونه استفاده شد.

آزمایش چهارم - سازگاری

برای انتقال گیاهان به گلدان و سازگار نمودن آن ها با شرایط محیطی، پیش از کاشت بسترهای کشت ضد عفونی شدند. در این مرحله از پنج بستر کشت، شامل کوکوپیت و پرلایت (1:1 حجمی)، کوکوپیت و پرلایت (3:0:5 حجمی)، کوکوپیت و پرلایت (1:1 حجمی) استفاده شد. گیاهان پس از انتقال به گلدان در داخل ظرف هایی با سر پوش شفاف و دارای سوراخ در دستگاه مه افشان قرار داده شده، هفته اول پس از انتقال، هر روز سرپوش ها به مدت 5 دقیقه برای هوادهی برداشته شد. از هفته دوم گیاهچه ها با محلول غذایی $MS \frac{1}{2}$ تغذیه شدند و مدت هوادهی به 15 دقیقه در روز افزایش یافت. سپس به تدریج با باز کردن تدریجی سوراخ ها و حذف سرپوش ها گیاهان با شرایط محیطی جدید سازگار شدند.

محاسبات آماری

پس از ثبت داده ها در نرم افزار EXCEL، تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار JMP و مقایسه میانگین به روش HSD انجام شد.

نتایج و بحث

ضد عفونی و استقرار جوانه

مطابق نتایج مقایسه میانگین (جدول 1) واکنش نوع ریز نمونه به فاکتورهای ضد عفونی سطحی متغیر می باشد. هیپوکلریت سدیم 10 درصد کمترین مقدار آلودگی را داشتند و روند کاهش آلودگی حاکی از افزایش غلظت هیپوکلریت سدیم است. اما سایر فاکتورهای ضد عفونی، از جمله اتانول دارای بیشترین درصد آلودگی بودند. به عبارت دیگر نوع ریز نمونه بر درصد آلودگی تاثیر دارد، کمترین میزان آلودگی مربوط به ریز نمونه سال جاری می باشد. لازم به ذکر است با این که درصد آلودگی در تیمار اتانول بسیار بالا بوده است ولی شستشوی ریز نمونه ها با آب و مایع ظرف شویی و سپس غوطه وری در اتانول 70٪ و در ادامه بطور جداگانه در هیپو

کلریت سدیم 10 درصد توانست درصد آلودگی را به حدود صفر برساند (شکل 1). به نظر می رسد نوع ریز نمونه نقش بسزایی در چگونگی تاثیر مواد ضد عفونی سطحی دارد. علاوه بر این زمان نمونه گیری می تواند بر درصد آلودگی و پاسخ ریز نمونه به کشت درون شیشه ای موثر باشد. مشاهده شده است که جوانه ها فعال در مقایسه با زمانی که در حال خواب هستند میزان آلودگی کم تری را نشان دادند. در این آزمایش زمان نمونه گیری خرداد ماه بود که نتایج آن با نتایج کمالی و همکاران مطابقت دارد (10). ریز نمونه سال جاری نسبت به ریز نمونه یکساله از کم ترین آلودگی برخوردار بود. به نظر می رسد جوان بودن ریز نمونه، صاف بودن سطح پوست، داشتن مقدار کمتری کرک و فرو رفتگی سطحی وابسته به نوع ریز نمونه است (5) و هر قدر میزان کرک و فرو رفتگی سطحی در ریز نمونه کم تر باشد، سطح تماس مواد ضد عفونی سطحی افزایش یافته و اثر گذاری آن ها نیز بهبود می یابد. علاوه بر این شستشو با آب جاری و مایع ظرف شویی با افزایش کشش سطحی احتمالاً تماس مواد ضد عفونی با ریز نمونه را افزایش می دهد و باعث از بین بردن آلودگی هایی همانند گرد و خاک می شود (22).

تجزیه و تحلیل داده های درصد رشد نشان داد (جدول 1) که درصد رشد جوانه های با توجه به نوع نمونه یک هفته پس از کشت در محیط استقرار اولیه، متفاوت بود. درصد رشد تنها در بهترین فاکتورهای ضد عفونی سطحی (هیپو کلریت سدیم 10 درصد در 10 دقیقه) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد غلظت هیپوکلریت سدیم بر رشد جوانه ها تاثیر گذاشته است. همچنین نوع ریز نمونه تاثیر مثبتی بر درصد رشد دارد با توجه به (جدول 2) و شکل (1) بالاترین درصد رشد مربوط به نمونه های سال جاری و هیپوکلریت سدیم 10 درصد به مدت 10 دقیقه است. هیپو کلریت سدیم سبب اکسید شدن سلول های میکروارگانیسم شده و اتانول، ماده ای دهیدراته کننده بوده که باعث تخریب غشای سلولی، از هم پاشیدگی سریع پروتئین ها و در ادامه برهم خوردن متابولیسم سلول می شود (8 و 11). لذا، می توان چنین نتیجه گرفت که کاربرد متناوب این دو ماده سبب تخریب بهتر سلول باکتری و پاتوژن ها شده و غلظت و زمان بالاتر تیمار، اثر بخشی آن ها را بهبود بخشیده است. با این وجود نوع ریز نمونه بر چگونگی نفوذ هیپوکلریت سدیم تاثیر گذاشته و به همین دلیل بیشترین درصد رشد جوانه در نمونه سال جاری مشاهده شد (14).

پرآوری

تعداد شاخساره: نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که تعداد شاخه در محیط کشت های مختلف با هم تفاوت های معنی دار داشته و نوع تنظیم کننده رشد نیز بی تاثیر نیست (جدول 2). در بین

غلظت 1 میلی گرم در لیتر آن در محیط کشت DKW بیشترین درصد پرآوری را داشته است (شکل 2، 3 و 4).

فاکتورهای مختلف تعداد شاخه می توان این طور بیان کرد که تنظیم کننده رشد BAP با غلظت 2 میلی گرم در لیتر در محیط کشت MS و

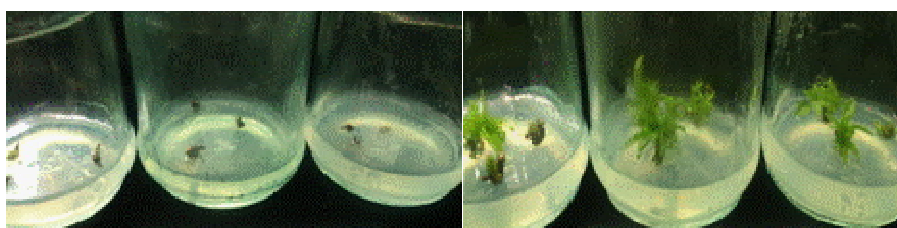
جدول 1- اثر تیمارهای ضد عفونی بر درصد آلودگی و فعالی ریزنمونه ی میروبالان 29C

Table 1. The effects of sterilization treatments on contamination and active percent of explants Myrobalan29C

نوع نمونه	تیمار ضد عفونی	درصد فعالی	درصد آلودگی
Explant type	Estrelization treatment	Active precent	Polletion precent
شاخه سال جاری Herbaceous shoot	اتانول 70% 1 دقیقه	8.0c*	80.0a
	Etanol 70% 1 min		
	هیپو کلریت سدیم 10% 10 دقیقه	66.6a	4.0c
شاخه یکسال Annual shoot	اتانول 70% 1 دقیقه	8.5c	80.0a
	Etanol 70% 1 min		
	هیپو کلریت سدیم 10% 10 دقیقه	60.0b	4.0b
	Hypo chlorit edium 10% 10 min		

میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح 5% نمی باشد.

* Mean values followed by the same letters within a column are not significantly different according at 5 % level



شکل 1- اثر تیمار ضد عفونی بر درصد آلودگی و فعال شدن از چب به راست نمونه ضد عفونی با اتانول 70% - ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم 10%
Figure 1- The effects of sterilization treatments on contamination and active explant. Left to right. (Ethanol, 70%, 1 min)- (Sodium hypochlorite, 10%, 10 min).

رشد در سطح یک در صد معنی دار بود. ولی تاثیر محیط های کشت و اثر متقابل آنها بی معنی بود (جدول 2). با این وجود محیط کشت MS عاری از تنظیم کننده های رشد بهترین کیفیت گیاهچه را داشت (جدول 2).

تکثیر و پرآوری شاخساره در کشت درون شیشه ای تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک های معدنی مواد آلی، کربوهیدرات ها، تنظیم کننده های رشد و شرایط محیطی قرار می گیرد که از بین آنها، نقش نسبت اکسین به سایتوکینین از همه مهم تر است (17). نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخساره های جدید است. بنابراین با افزایش غلظت BAP در محیط کشت MS از 1 میلی گرم در لیتر به 2 میلی گرم در لیتر شاخساره های بیشتر و طویل تری نسبت به محیط کشت DKW تولید شدند (25).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثرات متقابل بین محیط کشت و تنظیم کننده رشد از نظر تعداد شاخساره و طول شاخساره در سطح یک معنی دار بود. سلیمانپور و همکاران (16) گزارش کردند با

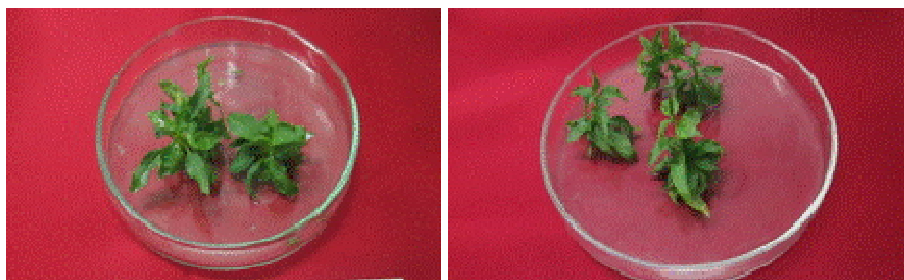
میانگین طول شاخساره : میانگین طول شاخساره ها در محیط کشت های مختلف و غلظت های مختلف تنظیم کننده ها رشدی مورد بررسی، متفاوت بود. در عین حال واکنش این پایه به فاکتورهای بکاربرده شده، متفاوت بود. محیط کشت MS و غلظت 1 میلی گرم در لیتر بیشترین تاثیر را در رشد طولی شاخساره داشتند. با افزایش غلظت BAP طول شاخساره کمتر شد (جدول 2)

میانگین تعداد برگ : میانگین تعداد برگ ها در محیط های کشت و فاکتورهای مورد بررسی، متفاوت بود. تاثیر محیط های کشت بر تعداد برگ در سطح یک درصد معنی دار بود ولی تاثیر غلظت های مختلف تنظیم کننده ها رشد معنی دار نبود (جدول 2). بر اساس نتایج بدست آمده، محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین بیشترین تعداد برگ را داشتند. محیط های کشت عاری از تنظیم کننده رشد و یا غلظت های بالاتر BAP کمترین تعداد برگ را شامل شدند (جدول 2).

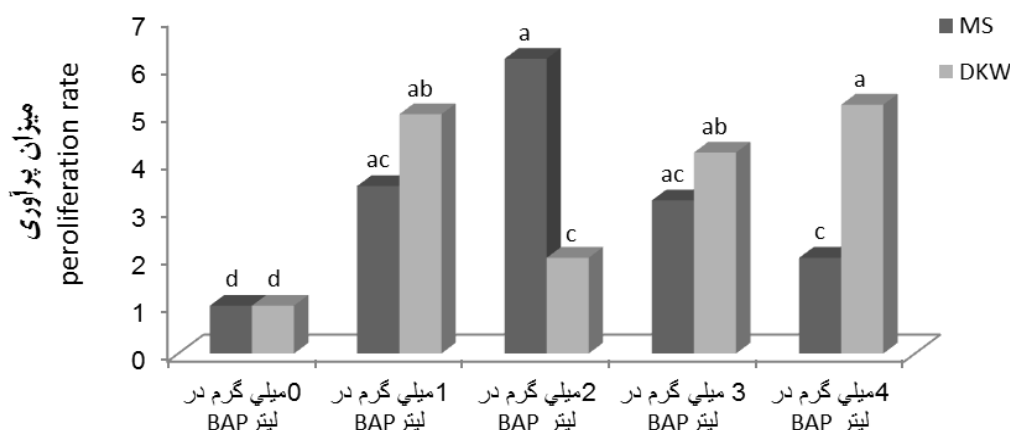
ارزیابی کیفیت گیاهچه: نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد، کیفیت گیاهچه تحت تاثیر غلظت های مختلف تنظیم کننده های

گیاچه، بهترین کیفیت مربوط به محیط کشت DKW به دلیل کم بودن غلظت نمک ها در این محیط است (9). در این پژوهش مشخص شد که نوع محیط کشت تاثیر بسزایی بر سلامت گیاچه ها و در نتیجه پرآوری موفق ریز نمونه ها دارد، به طوری که زردی و نکروز شدن برگ ها و مردن انتهای بافت برگ ها از جمله نارسایی های رشد بودند که در محیط کشت MS مشاهده شدند و این نتایج با یافته های پرز تورنر و همکاران (19) که محیط کشت WPM را برای ریزافزایی ارقام مختلف زردآلو مناسب تشخیص دادند، مطابقت دارد. در کلسیم عنصری است که نقش بسیار مهم در ساختار دیواره یاخته ای دارد، ولی دارای تحرک بسیار کمی در داخل بافت گیاهی بوده و بازده و حرکت آن در داخل گیاه تابع تعرق گیاه است و در شرایط درون شیشه ای زمانی که میزان رطوبت بالا باشد تعرق گیاه و در نتیجه جذب کلسیم کاهش پیدا کرده و قهوه ای شدن و مردن بافت ها در نتیجه تجزیه و تخریب یاخته ها رخ می دهد (14).

کاهش غلظت کلسیم و منیزیم در محیط کشت DKW و با افزایش غلظت BAP شاخه زایی SL-64 افزایش می یابد. اما با در نظر گرفتن تاثیر نوع ژنوتیپ بر درصد شاخه زایی، پایه میروبالان 29c بیشترین شاخه زایی در محیط MS داشتند (9). این در حالی است که برای دورگه گوجه × زردآلو ذوالفقاری نسب و همکاران (25) بهترین نتیجه را در مرحله شاخه زایی از محیط WPM گرفتند. این نتایج همگی موید واکنش متفاوت ژنوتیپ ها به محیط های کشت، تنظیم کننده های رشد و شرایط کشت می باشد، به طوری که چاننوتا و همکاران (3) نیز ریزافزایی دو رقم بادام نر پاریل و نپولوس اولترا را از نظر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم کننده های رشد بررسی کرده و گزارش نمودند که بهترین محیط کشت برای پرآوری رقم نر پاریل محیط AP به همراه BAP و IBA می باشد و برای رقم نپولوس اولترا محیط MS با BAP و IBA است. باتوجه به اینکه تعداد شاخه در محیط کشت MS بیشتر است، در نتیجه تعداد برگ های گیاچه ها هم نسبت به محیط کشت DKW بیشتر می باشد. اما در مورد کیفیت



شکل 2- مقایسه پرآوری پایه رویشی میروبالان 29c گیاچه ها در محیط کشت مختلف از چپ به راست. محیط کشت DKW - محیط MS
Figure 2- Compersiune in different culture media of plants Proliferation vegetative rootstock Myrobalan29c. From left to right. (DKW)- (MS).



شکل 3- اثر متقابل محیط کشت × غلظت تنظیم کننده رشد بر میزان پرآوری تکثیر میروبالان 29c
Figure 3- The effect interaction between culture media × growth regulators on propagation proliferation rate of Myrobalan29C



شکل 4- مقایسه سرعت پرآوری پایه ی رویشی میروبالان 29c در غلظت های مختلف BAP در محیط کشت MS. از چپ به راست . شاهد - غلظت 1 میلی گرم درلیتر - غلظت 2 میلی گرم درلیتر - غلظت 3 میلی گرم درلیتر - غلظت 4 میلی گرم درلیتر

Figure 4- Compersuine differente growth regulatorsBAP in culture media MS proliferation rate vegetative rootstock Myrobalan29c. from left to right .A (0mg/LBAP).B(1mg/l BAP).C(2mg/l BAP).D(3mg/l BAP).E(4mg/l BAP)

ریشه‌زایی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده های مرحله ریشه زایی نشان داد با افزایش غلظت IBA از 0 به 2 میلی گرم در لیتر درصد ریشه زایی، طول ریشه، تعداد ریشه، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه افزایش می یابد (جدول 2). بطوری که بهترین تشکیل ریشه در محیط کشت MS با 100٪ ریشه زایی و بطور متوسط با 6/75 سانتی متر طول مشاهده شد (جدول 2 و شکل 5). گوراج و همکاران طی تحقیقی اعلام کرد کلسیم برای انقباض دیواره سلولی مناسب می باشد و

کمبود کلسیم باعث ضعیف شدن رشد ریشه می شود (8). دامینا و همکاران همچنین گزارش کرد که محیط کشت MS ½ (غلظت عناصر پر مصرف و کم مصرف به نصف کاهش یافت) بیشترین تعداد ریشه را در پایه آلو القاء کرد (4). القای ریشه با کاربرد 2 میلی گرم در لیتر IBA در کشت درون شیشه ای برای چند گونه از جنس *Prunus* گزارش شده است (20). معمولاً تولید ریشه در گیاهان تحت تاثیر سنتز، متابولیسم، انتقال و مسیرهای انتقال علایم اکسین می باشد (8 و 23).

جدول 2- اثر متقابل محیط کشت × تنظیم کننده رشد بر تعداد شاخه، طول شاخساره، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه

Table 2- The effecte interaction between culture media × growth regulators on the numbers, the length and quality of the shoots and number leaf

محیط کشت Culture medium	تنظیم کننده رشد (میلی گرم در لیتر) Growth regulator(mg/L ⁻¹)	تعداد شاخه Shoot number	طول شاخه Shoot length	تعداد برگ Leaf number	کیفیت Quality
MS	0	1.00d	1.95b	7.91c	a
	1	3.58ab	2.51a	10.16ab	b
	2	6.16a	2.33a	10.33a	b
	3	3.25bc	2.31a	9.66b	b
	4	1.83c	1.86b	9.41b	b
DKW	0	1.00d	1.39c	7.08cd	ab
	1	4.83a	1.22cd	6.99c	cd
	2	1.75c	1.06cd	5.49de	d
	3	3.92bc	1.04d	6.91cd	bc
	4	4.08ab	0.88d	5.16e	cd

میانگین دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح 5٪ می باشد

* Mean values followed by the sameletters within a column are not significantly different at 5 % level



شکل 5- ریشه زایی در محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر IBA.

Figure 5- Rooting in culture media MS contain 2mg/l IBA

سازگاری

موفقیت ریزازدیادی به توانایی انتقال گیاهچه ها به بستر گلدان و سازگار کردن موفق آن ها به شرایط محیط بیرون بستگی دارد. در سازگاری گیاهچه های میروبالان^{29c}، مشخص شد که گیاهچه هایی به دلیل آمادگی قرار گرفتن در مقابل تنش محیطی ناشی از تغییر شرایط محیط بود و همچنین بهترین بستر کشت برای سازگاری، بستر کوکوپیت و پرلایت (1:1 حجمی) بود (شکل 6). سازگاری مستقیماً تحت تاثیر ریشه زایی بوده و بنابراین گیاهچه هایی که کیفیت ریشه

بالایی دارند بهترین سرعت القا را داشته اند (12). همچنین سازگاری موفق گیاهچه های زردآلو را با انتقال آن ها به گلدان های دارای پیت و پرلایت به نسبت 1 به 1 و کاهش تدریجی رطوبت به دست آوردند (19).

تشکر و قدردانی: از مسئولین دانشکده کشاورزی و مرکز تحقیقات و منابع طبیعی خراسان رضوی به خاطر مساعدت در انجام این طرح صمیمانه سپاسگزاری می شود.

جدول 3- اثر متقابل محیط کشت × تنظیم کننده رشد بر گیاهچه ریشه دار، طول ریشه، تعداد ریشه، ارتفاع ریشه، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه.
Table 3- The effect interaction between culture media × growth regulators on rooting plants, number plants, number and root length, leaf number and stem length and quality of explants

محیط کشت Culture medium	تنظیم کننده رشد growth regulators(mg/L ⁻¹)	تعداد گیاهچه ریشه دار Root Percent	طول ریشه Root length	تعداد ریشه Root number	ارتفاع گیاهچه stem length	تعداد برگ Leaf number	کیفیت Quality
MS	0	1.75b	5.75ab	7.00bc	5.75bc	15.75a	a
	1	2.75ab	3.75bc	10.25ab	5.75bc	13.25a	a
	2	3.25a	6.75a	10.75a	7.00ab	13.25a	a
	3	2.00b	5.50ab	13ab	8.75a	16.50a	a
DKW	0	1.75b	2.75c	2.75c	6.50b	1.50a	a
	1	2.25ab	3.00c	3.50c	3.75c	14.50a	a
	2	2.50ab	3.62bc	11.00ab	7.00ab	13.75a	a
	3	1.75b	4.00bc	6.50bc	6.50b	14.00a	a

میانگین های دارای حروف مختلف در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح 5% نمی باشند

* Mean values followed by the same letters within a column are not significantly different at 5 % level



شکل 6- مقایسه سازگاری گیاهچه در بسترهای کشت، از راست به چپ. کوکوپیت و پرلایت (3:0/5) - کوکوپیت - کوکوپیت و پرلایت (0/5:3) - پرلایت - کوکوپیت و پرلایت (1:1)

Figure 6- Compersium plants acclimatization in substrate from right to left. A (Coco Peat and Perlite 3:0/5 V). B (Coco Peat 100% V). C (Coco Peat and Perlite 0.5:3V). D (Perlite 100% V). E (Coco Peat and Perlite 1:1V).

منابع

- 1- Asadi A. A., Vedadi C., Rahimi M., and Naserian B. 2009. Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration in rose (*Morrasia*) under in-vitro conditions, Bioscience Research, 6(1): 40-45.
- 2- Azadi P., Khosh- Khui M., Beyramizadeh E., and Bagheri H. 2007. Optimization of factors affecting in vitro proliferation and rooting of *Rosa hybrida* L. cv. 'Rafaela', International Journal of Agricultural Research, 2(7): 626-631.
- 3- Channuntapipat Ch., Sedgley M., and Collins G. 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock *Titan* × *Nemagard*. Sci. Hort. 98:473-484.
- 4- Damiano C., Delia G. 2009. In vitro multiplication, rooting acclimatization and related protein profiles of rootstock citation (*Prunus.Salicina* × *prunus. Persica*). Acta Horticulturae, 812: 218-227.
- 5- Hartmann H.T., Kester D.E., and Davies F.T. 1990. Plant propagation, principles and practices. Prentice-Hall

- International, New Jersey, USA, Pp, 145-89.
- 6- Ganji Moghadam, A., and Abdollahzadeh A. 2009. Guide fruit trees rootstock (Translate). Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center, S155-184. (Edited book).
- 7- Gudin S. 2000. Rose: genetics and breeding. Plant Breeding Review, 17: 59-189.
- 8- George E. F. 2008. Plant propagation by tissue culture. Plant Cellular Reproduction, 18: 6-113.
- 9- Izad Panah. 2004. The effects of age and genotype on the way propagation Sweet Cherry (*Prunus avium*) in vitro. Natural Sources, 64: 63-70. (in Persian)
- 10- Kamali K., Majidi A., and Zarghami R. 2002. Determine the most suitable culture medium and growth conditions Micropropagation of vegetative GF677 (hybrid Paech × Almond) rootstock. Journal and seed, 17: 38-47. (in Persian)
- 11- Larson E. L., and Morton H. E. 1991. Disinfection, Sterilization and Preservation, In Alcohols.
- 12- Mahdavyan M., Bozari N., and Abdollahi H. 2010. Effect of media and plant growth regulators on proliferation and rooting Mahaleb (Sent losi 64) of vegetative rootstock. Journal and seed, 1: 15-26. (in Persian)
- 13- Movsiuw A. 2011. In vitro propagation of virus-free Myrobalan 29c rootstock. GRI, 7349: 101-102.
- 14- Ruzic D. V., Vajovic. T. I., 2013. The effect of cytokinins types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry. Horticulture Scienc, 35: 12-21.
- 15- Sana B., Ghosh D., Saha M., and Mukherjee J. 2006. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma- Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. Process Biochemistry, 41(1): 208-215.
- 16- Soleymanpor A., and Bozari N. 2012. Effect of media and plant growth regulators in micro propagation Mahaleb (SL- 64) of vegetative rootstock. Especially a genetic Congress Iran, 12: 1-5.9. (in Persian)
- 17- Pati P. K., Rath S. P., Sharma M., and Ahuja P. S. 2005. Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose. Acta Horticulturae, 547: 147-158.
- 18- Plopa C., Dutu N., Isac V., Mazilu C., Ancu S. 2010. Factors Influencing in Vitro Propagation of Myrobalan Dwarf Plum Root stock. ISHS Acta Horticulturae, 966: 221-223.
- 19- Perez-Tornero O., Opez J.M.L. 2000. Effect of basal media and growth regulators on the in vitro propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Cannino, j. Hort. ci, Biotech, 75: 283-286.
- 20- Pruski K., Astatkle T. 2005. Tissue culture propagation of mongolian cherry (*Prunus froticosa*) and nanking cherry (*Prunus tomentosa*). Plant Cellular Tissue and Organ Culture, 82: 207-211.
- 21- Yadollahi A., Nazari Moghadam Aghae R., and Moeeni A. 2009. Effect composition BAP and NAA on proliferation Gisela rootstock. Especially a genetic Congress Iran, 3: 1-5. (in Persian)
- 22- Yari F., and Mosavi A. 2012. Optimization in vitro five varieties of cut roses (*Roza hybrida* L.). Biotechnology in agriculture, 10: 17-26.
- 23- Ying-Ning Z. 2010. Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Using Mature Stem Segments. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 38 (3): 214-218.
- 24- Zlesak D. 2006. Rose. In Flower Breeding and Genetics, 695-740 (Ed N. Anderson). Springer Netherlands.
- 25- Zolfaghari Nasab R., Khosro shahi M., Gerigoryan V., and Matlabi azar A. 2005. The effects in vitro propagation natural hybrid Apricot × plum. Journal of Horticultural Science and Technology, 5: 81-92 (in Persian)



Optimization of Factors Affecting in vitro Propagation of 'Myrobalan 29c' Rootstock

Z. Shabani¹- B. Abedi^{2*}- E. Ganjimoghadam³- A. Tehranifar⁴

Received: 04-05-2014

Accepted: 21-05-2017

Introduction: This study was conducted aimed to consider the effects of culture medium and the concentration of growth regulators on proliferation, rooting and the acclimatization of Myrobalan29C. This study was performed as a factorial experiment in a completely randomized design (CRD) with four replications where each plot contained five explants. Given the role of trees rootstock of growth rate vegetative in the early maturity, yield and disease resistance will be suitable rootstock that has an important role in program garden management. In total rootstock of fruit trees have be propagation sexual and asexual methods, however, given that in sexual reproduction the resulting dispersion characteristics and the resulting seedlings changed by genetics, it is tried for decades to asexual propagation methods in specially tissue culture methods healthy rootstock for mass propagation and used the development of orchards. Seedling rootstock Myrobalan had been used in the past. The rootstock can be positive features cited the ease of access, to be cheap, good yields after maturity. In study, the effects of NAA and BAP on proliferation of Gisala5 rootstock showed the most shoot treated in mediacontaining 1mg/l BAP. Investigated Chinese plum in vitro micropropagation showed that 1/2 MS media had the highest percentage rooting, and acclimatization rooted plantlets to greenhouse conditions was using the system miss successfully. Due to the importance and essential to achieve an efficient protocol for the mass propagation of Myrobalan 29C in Iran, this study was conducted with the main purpose of evaluating the most suitable media culture and plant growth regulators in micropropagation of Myrobalan 29C.

Material and Methods: The explants were collected from shoots of Myrobalan 29C rootstock maintained in the experimental greenhouse of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Centre (of Mashhad, Iran), on June 25, 2013. The explants were washed by water and dishwashing liquid to removed surface contamination. Then they were divided to some parts containing one bud and were sterilized with ethanol 70% 1 min and sodium hypochlorite 10% at 10 min. Proliferation was performed in two kind of culture medium (MS and DKW) that supplemented with plant growth regulators BAP (0, 1, 2, 3, 4 mg l⁻¹). The rootstocks of in this step, after subculture three (21 days between each subculture), the numbers, the length and quality of the shoots (explants strong growth, with no signs of vitrification, necrosis of leaf are yellowing terminal meristem), b- less than 15% have the symptoms of vitrification, necrosis of leaf are yellowing terminal meristem, and c- explant weak, 15-30% have the symptoms of vitrification, necrosis of leaf are yellowing Terminal meristem) were measured. This stage was carried with four replications and each replicates with five samples. Two culture media (MS and DKW) were used for rooting, which supplemented with indole-3-butyric acid (IBA) at four levels (0, 1, 2, 3 mg l⁻¹). This stage was carried with four replications and each replicates with three samples. After being rooted explants, the best cultured media and combination of rooting growth regulators number and root length, leaf number and stem length and quality of explants were recorded. Acclimatization used in substrate including Coco Peat - Perlite 3:0/5 V, Coco Peat 100%V, Coco Peat - Perlite 0.5:3V, Perlite100%V and Coco Peat - Perlite1:1V).

Results and Discussions: Results showed that the 10% sodium hypochlorite for 10 min, with 4% decay was the best treatment for sterilization. The results showed that the proliferation average was 6/16 in MS medium with 2 mg l⁻¹ BAP and the most percent of rooting and root length were about 100% and 2/51 cm in MS medium with 2mg l⁻¹ of IBA, respectively. The acclimatization of plantlets to greenhouse conditions was successful. The highest rate of plantlets survival (about 70%) was obtained from substrate Cocopit and Prlit (1; 1 V). In the

1, 2 and 4- Master Horticulture, Assistant Professor and Professor, Department of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad

(*- Corresponding Author Email: abedy@um.ac.ir)

3- Associate Professor, KhorasanRazavi Research Center for Agriculture and Natural Resource

present study, explants year compared annual explant least contamination had enjoyed. It seems that the young explants, smooth the surface of the skin, having the least amount of crack depend on the type of surface depressions explants and the crack and lower depressions the surface explants increase surface contact area disinfectants and also improve its impact. In this study found that the type of medium a significant impacted on the health of plants and so the proliferation of explants was successful. Usually root production in plants under the influence of synthesis, metabolism, and transport is auxin signaling pathways. Therefore acclimatization directly affected the rooting of plants that had high quality and the best rate of induction.

Conclusions: The results of this research showed that we can duplicate Myrobalan29c rootstock by in vitro method. According in this research, MS media including BAP and IBA plant growth regulators are the most suitable for micro propagation.

Keyword: Acclimatization, Disinfection, Rooting and Proliferation



برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه با استفاده از پارامترهای زودیاخت خاک و شبکه

عصبی مصنوعی

حسین صبوری فرد¹ - عظیم قاسم نژاد^{2*} - خدایار همتی³ - ابوطالب هزارجریبی⁴ - محمودرضا بهرامی⁵ - فهیمه نصرتی⁶

تاریخ دریافت: 1393/02/15

تاریخ پذیرش: 1396/02/13

چکیده

یکی از نیازهای مهم در برنامه‌ریزی تولید و فرآوری گیاهان دارویی به منظور حصول عملکرد بالا و با کیفیت مطلوب، ارزیابی اولیه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه است که می‌توان با اجتناب از کاربرد غیرضروری آزمایشات متنوع خاکشناسی، هزینه تولید را به حداقل کاهش داد. مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.) از جمله گیاهان دارویی پرکاربرد است که میزان اسانس و ترکیبات آن شاخص کیفی گیاه محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه با استفاده از پارامترهای زودیاخت خاک شامل: بافت خاک، مواد آلی، pH، EC، فسفر، پتاسیم، نیتروژن و درصد کربن با بهره‌گیری از شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد. بدین منظور 53 نمونه از خاک زراعی شهرستان نیشابور جمع‌آوری و پس از انجام آزمایشات ویژگی‌های زودیاخت خاک نتایج اولیه بدست آمد. بر پایه نتایج تجزیه حساسیت، کربن آلی، نیتروژن، فسفر، ماده آلی، پتاسیم، اسیدیته، شوری، رس، سیلت و شن به ترتیب به عنوان پارامترهای حساس در برآورد عملکرد بیومس بودند. در نهایت به منظور تخمین سریع و کم هزینه عملکرد بیومس، با استفاده از پارامترهای حساس، مدل‌های گوناگون طراحی شدند. نتایج نهایی مقایسه مدل‌ها نشان داد که بهترین مدل از نظر دقت و سرعت تخمین عملکرد بیومس مدلی بود که از ورودی با پارامتر بافت خاک و کربن آلی استفاده شد.

واژه‌های کلیدی: بافت خاک، فرآوری گیاهان دارویی، خصوصیات خاک

مقدمه

و میزان مواد موثره گیاه دارند، تغییر ایجاد نمود (12). لیکن روابط بین کمیت و کیفیت گیاهان دارویی در برابر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بسیار پیچیده بوده و عمل تخمین تغییرات خصوصیات کیفی گیاهان دارویی تحت تاثیر پارامترهای خاک را با مشکل روبرو می‌کند. امروزه با ورود مدل‌های رگرسیونی چند متغیره و مدل‌های شبکه مصنوعی در تحقیقات بسیار از روابط پیچیده موجود در طبیعت را پیدا شده است. به گونه‌ای که تخمین‌های قابل قبولی از یک پارامتر سخت یافت و پر هزینه از روی برخی از پارامترهای زودیاخت ممکن شده است. شبکه عصبی مصنوعی شبیه‌سازی از دستگاه عصبی انسان است و در واقع تقلیدی از مغز و شبکه اعصاب انسان است. در این شبکه سعی بر آن است که ساختاری تهیه شود که همانند مغز قدرت یادگیری، تعمیم‌دهی و تصمیم‌گیری داشته باشد (9 و 13). در این گونه ساختارها هدف این است که با معرفی عملکرد یک سیستم دینامیکی، مدل را آموزش داده، نحوه عملکرد سیستم را در حافظه مدل ذخیره می‌گردد و از آن برای مواردی که قبلاً با آن مواجه نشده، استفاده شود. کاربرد این سیستم‌ها در ایران و به خصوص در علوم کشاورزی در آغاز راه است. اما به دلیل توانایی آن‌ها

در حال حاضر تقاضای روزافزونی برای داروهای با منشأ طبیعی وجود دارد که عمدتاً به دلیل طیف گسترده فواید زیست شناختی، بر خورداری این داروها از خاصیت امنیت غذایی بیشتر، سازگاری بهتر با بدن و قیمت ارزان‌تر آن‌ها نسبت به داروهای شیمیایی است. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، عناصر غذایی و اسیدیته خاک از جمله عوامل محیطی موثری هستند که در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی از اهمیت والایی برخوردارند. لذا زمانی می‌توان روند افزایشی در کمیت و کیفیت گیاهان دارویی انتظار داشت که بتوان در میزان عناصر غذایی خاک که نقش موثری در رشد و نمو

1، 2 و 3 - به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*) - نویسنده مسئول: (Email: Sabouri@tvu.ac.ir)

4 - استادیار گروه مهندسی آب، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
5 - دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه فردوسی مشهد
6 - دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.33666

سازی عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه انجام نشده است. این پژوهش به منظور تعیین حداقل پارامترهای ورودی موثر در تعیین عملکرد بیومس این گیاه با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی و کاربرد این نوع شبکه‌ها برای برآورد عملکرد بیومس مرزه تابستانه با استفاده از پارامترهای زود یافت خاک صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال 1391 در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی نیشابور و بصورت طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار و بصورت گلدانی انجام شد. از مناطق مختلف شهرستان نیشابور 53 نمونه خاک در سه تکرار تهیه شده و پس از انجام آزمایشات مختلف خاکشناسی در آنها گیاه مرزه کاشته شد. برای اندازه‌گیری پارامترهای زودیافت خاک، مقادیر فراوانی نسبی اندازه ذرات خاک به روش هیدرومتری (4)، کربن آلی از روش تیتراسیون (5)، میزان فسفر قابل جذب از روش السن¹، میزان پتاسیم قابل جذب با استفاده از دستگاه فلیمتومتر، ازت کل از روش کجلدال (3)، میزان اسیدیته و شوری خاک به ترتیب از دستگاه pH متر و EC سنج استفاده شد.

کشت و عملیات داشت و برداشت: بذور مرزه تابستانه از مرکز تحقیقات کشاورزی نیشابور تهیه و پس از ضدعفونی خاک‌های جمع‌آوری شده با قارچ کش بنومیل 2 درصد در هر گلدان 5 عدد بذور کشت شد. پس از عملیات آبیاری به روش بارانی در مرحله 4 برگی تنک کردن انجام شد و یک بوته قوی تر نگه داشته شد. نمونه‌گیری از گیاهان تیمارهای مختلف در شرایط یکسان، 90 روز پس از کاشت صورت گرفت. به منظور تعیین وزن تر و خشک از ترازوی دیجیتال 0/001 استفاده شد و برای خشک‌نمودن نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری وزن خشک آن‌ها از دمای 40 درجه سانتی‌گراد در آون بمدت 24 ساعت استفاده شد.

طراحی شبکه: در نهایت رابطه‌های بین عملکرد بیومس گیاه مرزه و پارامترهای زودیافت خاک با تجزیه شبکه عصبی مصنوعی مشخص شد. قبل از آموزش شبکه عصبی، داده‌های ورودی به آن استاندارد شدند. برای استاندارد نمودن داده‌ها از رابطه 1 استفاده شده است:

$$X_n = 0.5 + 0.5 \left(\frac{X - X_{\text{mean}}}{X_{\text{max}} - X_{\text{min}}} \right) \quad \text{رابطه 1}$$

که در آن: X_n معرف داده نرمال شده، X معرف داده‌ی مشاهده-ای، X_{mean} ، X_{min} و X_{max} به ترتیب معرف داده‌های مشاهده‌ای میانگین، حداکثر و حداقل می‌باشند. سپس پارامترهای زودیافت خاک به عنوان پارامترهای ورودی و عملکرد بیومس به عنوان خروجی شبکه در نظر گرفته شد. 60 درصد داده‌ها (53 نمونه خاک) جهت

در مدل‌سازی فرآیندهای بسیار پیچیده که تعداد عوامل تاثیرگذار زیادی دارند، امکان استفاده گسترده از آن در علوم کشاورزی وجود دارد. اغلب مطالعات شبکه مصنوعی در زمینه تخمین عملکرد در گیاهان استراتژیک همچون گندم انجام شده است به عنوان مثال شاپ و همکاران (15) بیان کردند که یکی از مزیت‌های استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی نسبت به مدل‌های قدیمی این است که نیازمند تعیین یک تابع خاص برای بیان رابطه میان داده‌های ورودی و خروجی نیست، وو و یی (18) نیز از دو روش شبکه‌های عصبی مصنوعی و رگرسیون چندمتغیره برای پیش‌بینی عملکرد گندم در ارتباط با مصرف کود ازته استفاده کردند و نشان دادند که استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی روش جایگزین مناسبی برای تجزیه و تحلیل رگرسیونی می‌باشد. اسمیت و همکاران (16) مشاهده کردند که عملکرد پیش‌بینی شده گندم در مرحله طویل شدن ساقه 46 درصد تغییرات عملکرد واقعی را توضیح داد درحالی‌که عملکرد پیش‌بینی شده در مرحله گرده افشانی 56 درصد این تغییرات را توضیح می‌داد. به عبارتی دیگر با پیشرفت دوره رشد و وارد شدن تعداد بیشتری از عوامل موثر بر عملکرد درمدل، دقت مدل پیش‌بینی در پیش‌بینی عملکرد افزایش یافت. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که در شرایط دیم؛ عوامل جوی تعیین‌کننده عملکرد می‌باشند، اما لوبل و همکاران (8) با استفاده از روش‌های رگرسیونی چندمتغیره نشان دادند که در شرایط کشت گندم آبی مدیریت زراعی عامل اصلی تعیین‌کننده عملکرد گندم بود. دراموند و همکاران (4) جهت تعیین روابطی میان خصوصیات خاک، توپوگرافی و عملکرد غلات در منطقه میسوری آمریکا مطالعاتی را انجام دادند و مشاهده نمودند که روش شبکه‌های عصبی مصنوعی نسبت به روش‌های رگرسیونی دارای خطای کمتری می‌باشد. کاول و همکاران (7) و آواز (1) شبکه‌های عصبی مصنوعی را جهت تعیین بازده گیاه گندم در منطقه پامپاس آرژانتین به کار برد. وی نسبت بارندگی به تبخیر و تعرق پتانسیل محصول را به عنوان مهمترین فاکتور آب و هوایی موثر بر بازده این محصول معرفی نمود. نوروزی (11) از شبکه‌های عصبی و مصنوعی به منظور پیش‌بینی عملکرد گندم دیم در مناطق نیمه‌خشک و کوهستانی غرب ایران استفاده نمودند و بیان داشتند که شاخص انتقال رسوب مهمترین عامل توپوگرافی بر میزان عملکرد این گیاه بوده و میزان پروتئین موجود در دانه‌ها تحت تاثیر میزان نیتروژن کل خاک می‌باشد. کاول و همکاران (7) به بررسی کارایی مدل‌های شبکه عصبی در تخمین ذرت علوفه‌ای و سویا در منطقه مریلند پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که مدل‌های شبکه‌های عصبی نسبت به مدل‌های رگرسیونی از دقت بیشتری برخوردارند. کاربرد این مدل‌ها برای تخمین میزان محصول در گیاه ذرت علوفه‌ای و سویا در اقلیم منطقه مریلند مناسب ارزیابی شد. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه کاربرد مدل‌های شبکه عصبی مصنوعی در شناسایی حداقل پارامترهای ورودی مورد نیاز برای شبیه

جدول 1- توصیف آماری خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک‌ها

Table 1- Statistical describe the chemical and physical properties of soils

پارامتر	حداقل	حداکثر	میانگین	ضریب تغییرات	چولگی
Parameter	Minimum	Maximum	Average	Coefficient of variation	Skew
OM	0.11	3	0.9	0.61	1.45
C	0.01	1.6	0.57	0.56	0.32
EC	0.22	4.58	0.31	0.75	1.08
pH	7.1	8.5	7.6	0.04	0.65
N	0.002	0.15	0.05	0.47	0.95
P	0.55	33.6	5.73	0.93	2.58
K	144.5	600	383	0.27	-0.25
Clay	6	24	12	0.29	1.2
Silt	9	26	16	0.23	0.21
Sand	61	76	72	0.05	-1.02

تجزیه حساسیت: بعد از مدل سازی عملکرد بیومس با 10 پارامتر بوسیله شبکه عصبی مصنوعی و بدست آوردن بهترین شبکه از نظر پارامترهای آماری، برای بدست آوردن حساس ترین پارامترها، تجزیه حساسیت به روش ضریب بدون بعد حساسیت (6) انجام شد. جدول 2 نتایج تجزیه حساسیت را نشان می دهد. هیل (6) در پژوهش های خود بیان می کند که اگر مقدار ضریب حساسیت پارامتری از 0/1 بیش تر باشد، آن پارامتر جز پارامترهای حساس مدل محسوب می شود. بر طبق نتایج هیل (6)، در این پژوهش، عملکرد بیومس به همه پارامترها حساس می باشد. اما از آنجایی که هدف این پژوهش تخمین سریع عملکرد بیومس (با حداقل تعداد آزمایش و پارامترهای مورد نیاز) بود، بنابراین حساس ترین پارامترها در عملکرد بیومس مشخص و با آن ها مدل سازی انجام شد. از پارامتر سیلت به بعد، ضریب حساسیت تغییر چندانی نکرد. از این رو پارامترهای کربن آلی، نیتروژن، فسفر، ماده آلی، پتاسیم، اسیدیته، شوری، رس، سیلت و شن به ترتیب به عنوان حساس ترین پارامترها انتخاب گردید.

جدول 2- نتایج تجزیه حساسیت پارامترهای زود یافت خاک

Table 3- Analysis of sensitivity of soil readily available

پارامتر	ضریب حساسیت نسبی
Parameter	Relative sensitivity
C	1
N	0.866
P	0.807
OM	0.804
K	0.711
PH	0.677
EC	0.656
Clay	0.646
Silt	0.602
Sand	0.600

طراحی مدل های مختلف شبکه عصبی مصنوعی با پارامترهای

آموزش مدل، 20 درصد داده ها (10 پارامتر خاک) جهت انجام فرآیند اعتبارسنجی مدل و 20 درصد (10 پارامتر خاک) به عنوان داده های آزمون مدل انتخاب گردید. به منظور آموزش شبکه عصبی، از نرم افزار Matlab7.9 شبکه MLP استفاده شد. در این پژوهش برای انجام تجزیه حساسیت مدل از ضریب بدون بعد حساسیت (6) استفاده گردید. همچنین برای ارزیابی و مقایسه عملکرد مدل های مختلف، از ضریب تبیین (R^2) و جذر میانگین مربعات خطا (RMSE) بین داده های اندازه گیری شده و پیش بینی شده استفاده شد. بیان ریاضی آماره RMSE به صورت رابطه 2 می باشد.

$$RMSE = \frac{\sqrt{\sum (t-a)^2}}{N} \quad \text{رابطه 2}$$

که در آن، a و t : به ترتیب مقدار پیش بینی و اندازه گیری شده پارامتر بیومس و N تعداد داده ها است.

شبکه عصبی مصنوعی برای همه مدل ها، با الگوریتم آموزشی لونیگ-مارکوارت به صورت یک لایه پنهان، تابع آستانه Logsig و برای لایه پنهان و Tansig برای لایه خروجی انتخاب گردید.

نتایج و بحث

توصیف آماری ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک ها در جدول 1 خلاصه شده است. تغییر پذیری خاک، عنصر کلیدی در مدیریت ویژه مکانی خاک است و اطلاعات ارزشمندی در زمینه ذات و سرشت خصوصیات خاک درون مزرعه در اختیار ما قرار می دهد (2). همان گونه که در جدول 1 مشاهده می شود، در بین متغیرهای شیمیایی، pH دارای کمترین ضریب تغییرات (0/04 درصد) می باشد. در عین حال ضریب تغییرات P در بین متغیرهای شیمیایی از همه بالاتر و برابر 0/93 است. مقادیر ضریب چولگی ارائه شده در جدول 1 موید این مطلب است که تمامی متغیرها به جز پارامتر فسفر از توزیع نرمال برخوردارند و ضریب چولگی بین -1 و +1 قرار دارد. پارامترهای مذکور دارای توزیع لوگ نرمال بودند.

مدل سازی شبکه عصبی مصنوعی: در مدل سازی عملکرد بیومس با 10 پارامتر برای 53 نمونه خاک، بهترین آرایش لایه پنهان با الگوریتم آموزشی لونیگ-مارکوارت به صورت یک لایه پنهان، 58 نرون، تابع آستانه Logsig برای لایه پنهان و Tansig برای لایه خروجی انتخاب گردید. مقادیر R^2 برای مراحل آموزش، اعتبارسنجی، آزمون و کل به ترتیب برابر 0/710، 0/700، 0/694 و 0/708 می باشد. بالا بودن مقادیر R^2 و پایین بودن مقادیر RMSE یاد شده بیانگر نزدیک بودن داده های پیش بینی با داده های اندازه گیری و دقت بالای مدل در برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه است.

برخورد دارند به ترتیب با افزایش تعداد پارامترهای ورودی و افزایش تعداد آزمایش انجام شده، مدل‌های شبکه عصبی مصنوعی مختلفی به صورت جدول 3 ایجاد شد.

حساس: همان‌طور که از قبل اشاره شد، هدف از انجام این پژوهش برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه با پارامترهای ورودی کمتر و در دسترس‌تر و همچنین هزینه کمتر است. بنابراین با 10 پارامتر زود یافت خاک که در برآورد عملکرد بیومس از حساسیت بیشتری

جدول 3- طراحی مدل‌های مختلف شبکه عصبی مصنوعی بر اساس نتایج تجزیه حساسیت و حداقل تعداد آزمایش
Table 3- Design an artificial neural network models based on sensitivity analysis results and minimum testing

مدل Model	پارامتر ورودی Input parameter	تعداد آزمایش Number of tests
مدل 1 Model 1	بافت خاک soil texture	1
مدل 2 Model 2	کربن Carbon	1
مدل 3 Model 3	بافت خاک + کربن Soil texture + carbon	2
مدل 4 Model 4	بافت خاک + کربن + نیتروژن Soil texture + carbon + nitrogen	3
مدل 5 Model 5	بافت خاک + کربن + ماده آلی + pH Soil texture + carbon + organic matter + pH	3
مدل 6 Model 6	بافت خاک + کربن + ماده آلی + نیتروژن + pH Soil texture + carbon + organic matter + nitrogen + pH	4
مدل 7 Model 7	EC + بافت خاک + کربن + ماده آلی + pH EC + soil texture + carbon + organic matter + pH	4
مدل 8 Model 8	EC + بافت خاک + کربن + ماده آلی + پتاسیم + pH EC + soil texture + carbon + organic matter + potassium + pH	5
مدل 9 Model 9	EC + بافت خاک + کربن + نیتروژن + فسفر + ماده آلی + پتاسیم + pH EC + soil texture + carbon + nitrogen + phosphorus + organic matter + potassium + pH	6

پارامترهای ورودی به مدل‌ها (مدل 1 به مدل 9)، مقادیر R^2 و RMSE در یک دید کلی دارای روند رو به بهبودی باشند بدین منظور که میزان R^2 افزایش و RMSE کاهش یافته است.

در مدل‌سازی با شبکه عصبی مصنوعی، بهترین آرایش لایه پنهان با الگوریتم آموزشی لوبنبرگ مارکوفادرات به صورت یک لایه پنهان، تابع آستانه Logsig و برای لایه پنهان و Tansig برای لایه خروجی انتخاب گردید. نتایج مدل‌ها در جدول 5 آمده است. در شکل 1 خط برازش داده شده بین داده‌های پیش‌بینی شده در مقابل داده‌ها اندازه‌گیری شده عملکرد بیومس در مرحله آزمون برای مدل‌های 1 تا 9 نشان داده شده است.

مقایسه نتایج مدل‌های طراحی شده با پارامترهای حساس: بررسی نتیجه‌های جدول 5 نشان می‌دهد که اضافه شدن پارامترهای ورودی، باعث افزایش مقدار R^2 و کاهش مقدار RMSE در مراحل آموزش، اعتبارسازی و آزمون در عملکرد بیومس می‌شود که حاکی از بهبود دقت مدل، با افزایش تعداد پارامترهای ورودی در تخمین عملکرد بیومس می‌باشد که امری کاملاً بدیهی است. این نتیجه در تحقیقات شاپ و همکاران (15)، شاپ و لیچ (14)، مؤذن‌زاده و همکاران (10)

در مدل (1) با زود یافت‌ترین پارامترها (درصد شن، رس و سیلت) که از آزمایش بافت خاک بدست می‌آید مدل شبکه عصبی مصنوعی مختلفی ایجاد می‌گردد.

در مدل (2) با توجه به حداکثر بودن ضریب حساسیت کربن آلی فقط پارامتر کربن آلی بعنوان مدل شبکه عصبی مصنوعی ایجاد می‌گردد.

در مدل (3) علاوه بر پارامترهای بافت خاک، کربن آلی نیز به مدل (1) اضافه می‌شود.

در مدل (4) پارامتر نیتروژن، به مدل (3) افزوده شد.

در مدل (5) پارامتر ماده آلی و اسیدیته به مدل (3) افزوده شد.

در مدل (6) پارامتر نیتروژن به مدل (5) اضافه شد.

در مدل (7) پارامتر شوری به مدل (5) افزوده و مورد بررسی قرار گرفت.

در مدل (8) پتاسیم به مدل (7) اضافه شد.

در مدل (9) پارامترهای نیتروژن و فسفر به مدل (8) افزوده و مدل جدیدی از شبکه ایجاد شد.

انتظار کلی از مدل‌های 1 تا 9 این است که با افزایش تعداد

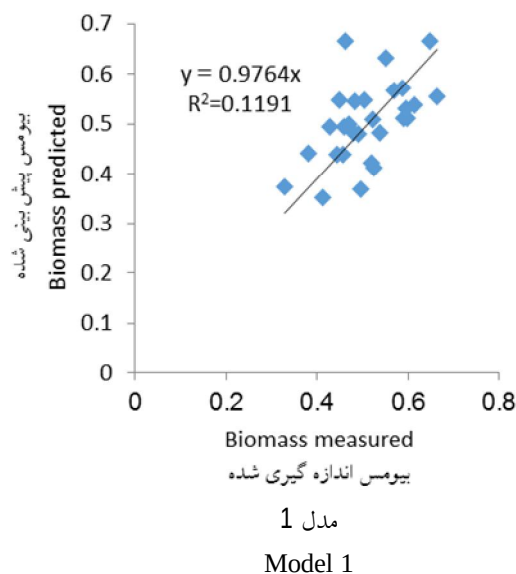
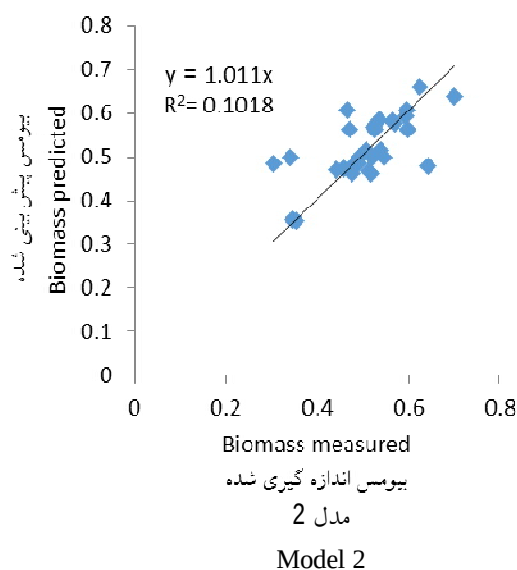
نیز مشاهده می‌شود. مدل‌های 1 و 2 برای برآورد بیومس دارای عملکردی ضعیف می‌باشند. با افزایش تعداد آزمایشات مورد نیاز از 1 به 2، عملکرد شبکه عصبی مدل 3 به یکباره بهبود قابل توجهی می‌یابد. لیکن همچنان نیازمند عملکرد بهتری می‌باشیم.

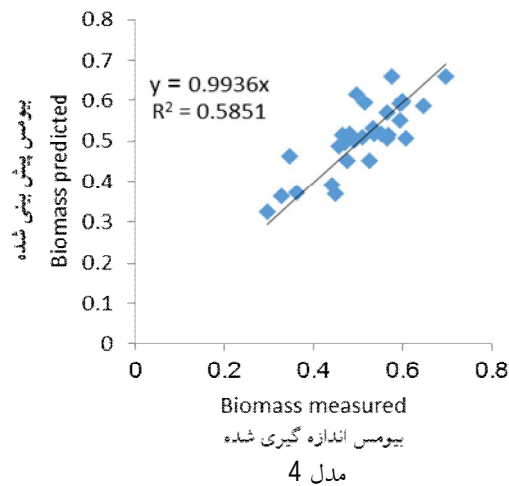
جدول 5- پارامترهای آماری محاسبه شده برای مراحل آموزش و آزمون
Table 5- Statistical parameters calculated for the training and testing stages

مدل Model	تعداد نرون Number of neurons	R^2 آموزش R^2 training	RMSE آموزش RMSE Training	R^2 آزمون R^2 test	RMSE آزمون RMSE test
مدل 1 Model 1	45	0.713	0.046	0.119	0.075
مدل 2 Model 2	45	0.388	0.065	0.101	0.068
مدل 3 Model 3	50	0.633	0.057	0.584	0.062
مدل 4 Model 4	45	0.63	0.054	0.58	0.053
مدل 5 Model 5	45	0.65	0.068	0.59	0.079
مدل 6 Model 6	50	0.67	0.056	0.60	0.057
مدل 7 Model 7	45	0.65	0.054	0.59	0.053
مدل 8 Model 8	50	0.68	0.049	0.061	0.068
مدل 9 Model 9	45	0.61	0.051	0.46	0.064

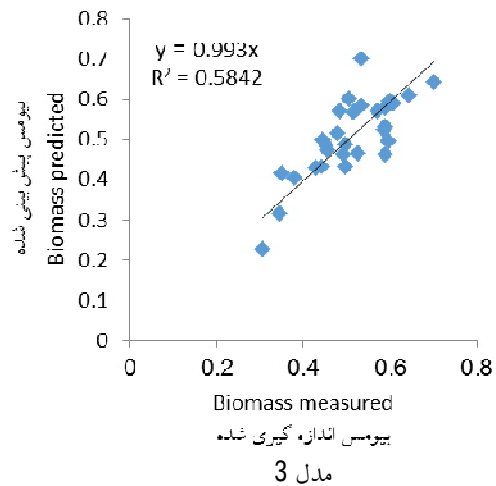
بودن کاربرد شبکه عصبی در برآورد عملکرد بیومس با استفاده از پارامترهای خاک بوده ولی همچنان جهت دسترسی به نتایج قطعی ادامه تحقیقات مشابه در این خصوص پیشنهاد می‌گردد.

مدل‌های 3 تا 9 دارای عملکرد تقریباً مشابهی می‌باشند. لیکن مدل شماره 3 با یک دید کلی بعنوان یک مدل بهینه انتخاب می‌گردد زیرا با تعداد پارامتر ورودی حداقل دارای عملکردی نزدیک به سایر مدل‌ها با تعداد پارامتر بیشتر بود. بررسی نتایج حاکی از امیدبخش

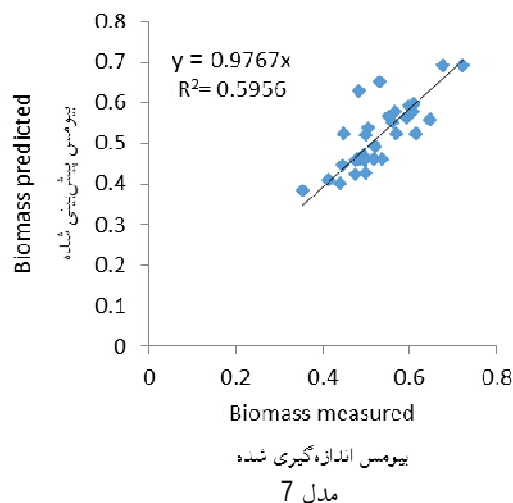




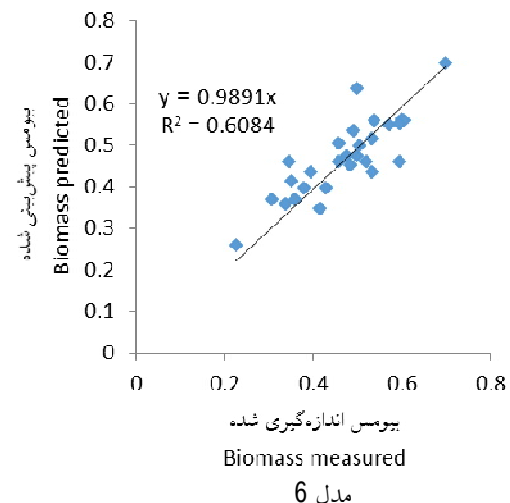
Model 4



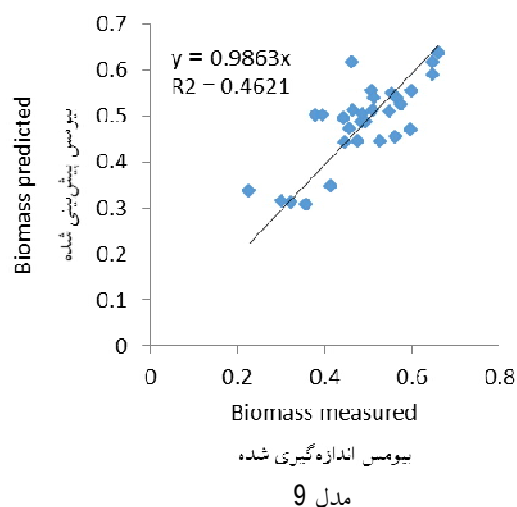
Model 3



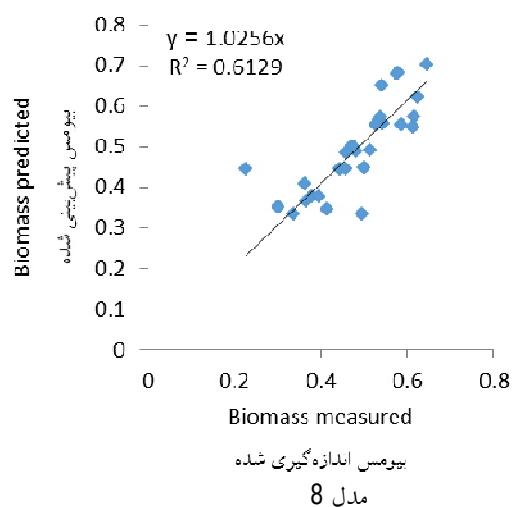
Model 7



Model 6



Model 9



Model 8

نتیجه گیری کلی

کربن و عناصر غذایی خاک بستگی دارد. در این تحقیق نشان داد که پارامترهای بافت خاک و کربن به ترتیب بعنوان مهمترین فاکتورهای موثر بر عملکرد بیومس در منطقه نیشابور هستند. نتایج بدست آمده در این مطالعه تنها برای منطقه مورد مطالعه و دیگر مناطق مشابه از نظر توپوگرافی، اقلیم، خاک و عملیات مدیریتی قابل استفاده است. هرچند که می توان نظیر چنین مطالعه ای با استفاده از شبکه های عصبی مصنوعی در مناطق دیگر نیز انجام داد.

نتایج نشان داد که روش شبکه عصبی مصنوعی دقت بالایی در برآورد عملکرد بیومس گیاه مرزه تابستانه دارد، به گونه ای که 80 درصد (ضریب تبیین در مرحله آزمون) تغییر پذیری عملکرد بیومس در منطقه مورد مطالعه را با استفاده از 10 خصوصیت زودیافت خاک نشان می دهد. عملکرد بیومس گیاه مرزه تا حد زیادی به بافت خاک، ماده آلی،

منابع

- 1- Alvarez, A. 2009. Predicting average regional yield and production of wheat in the Argentine Pampas by an artificial neural network approach. *Eur J. Agron.* 30: 70-77.
- 2- Ayoubi S., Khormali F., and Sahrawat K. 2009. Relation of barley biomass and grain yields to soil properties within a field in the arid region: Use of factor analysis. *Acta. Agr. Scand.* 59(2):107-117.
- 3- Bremner J.S., and Mulvaney C.S. 1982. Nitrogen-total. In A. L. Page (Ed.), *Methods of Soil Analysis*, Part 2. American Society of Agronomy (pp. 595-624). Madison, Wisconsin.
- 4- Drummond S.T., Sudduth K.A., Joshi A., Birrell S.L., and Kitchen N.R. 2003, Statistical and Neural Methods for Site-specific Yield Prediction, *Transactions of the American Society of Agricultural Engineering*, 46(1): 5-14.
- 5- Gee G.W., and Bauder J.W. 1986. Particle size analysis. P 383-411, In: *Methods of soil analysis*. Part 1. 2nd ed. Klute, A. (Ed). *Agron. Monogr.* 9. ASA. Madison. WI.
- 6- Hill M. 1998. Methods and guidelines for effective model calibration. U.S. Geological survey Water- Resources Investigations Rep. 98-4005.
- 7- Kaul M., Hill R.L., and Walthall C. 2005. Artificial neural networks for corn and soybean yield prediction. *Agriculture Systems*, 85:1-18.
- 8- Lobell D.B., Ortiz-Monasterio J.I., Addams C.L., and Asner G.P. 2002. Soil, climate, and management impacts on regional wheat productivity in Mexico from remote sensing. *Agricultural and Forest Meteorology*, 114: 31-43.
- 9- Menhaj M.B. 2001. Computational intelligence, fundamentals of neural networks. 2nd d., Amir Kabir University of Technology, Tehran: Iran. (in Persian)
- 10- Moazen zadeh R., Ghahraman B., Fathalian F., and Khoshnoodiyazdi A.A. 2009. Effect of type and number of input variables on moisture retention curve and saturated hydraulic conductivity prediction. *J. Water and Soil*. 23: 3. 57-70. (in Persian)
- 11- Norouzi M., 2009. Prediction of rainfed wheat yield using artificial neural network in Ardal district of Chaharmahal and Bakhtiari province. M.Sc. Thesis, Collage of iculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, 112 p. (in Persian)
- 12- Omidbaigi R. 2005. Production and processing of medicinal plants Vol. 2 Astane Quds Publ. Tehran, 438p. (in Persian)
- 13- Rao V., and Rao H. 1996. C++ Neural networks and fuzzy logic, BPB, New Dehli, India, pp: 380-381.
- 14- Schaap M., and Leij F. 1998. Using neural networks to predict soil water retention and soil hydraulic conductivity. *Soil and Till Res.* 47: 37-42.
- 15- Schaap M.G., and Bouten W. 1996. Modelling water retention curves of sandy soils using neural networks. *Water Resou. Res.* 32:3033-3040.
- 16- Smith R.C.G., Adams J., Stephens D.J. and Hick P.T. 1995. Forecasting wheat yield in a Mediterranean-type environment from the NOAA satellite. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46(1): 113-125.
- 17- Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-39.
- 18- Wu F.Y., and Yen K. K. 1992. Application of neural network in regression analysis. *Computers and Industrial Engineering*. 23: 93-95.



Assessment of Summe Savory (*satureja hortensis* L.) Biomass by Easily-Attainable Soil Parameters and Artificial Network

H. Sabourifard¹ - A. Ghasemnezhad² - Kh. Hemmati³ - A. Hezarjeribi⁴, M.R. Bahrami⁵ - F. Nosrati⁶

Received: 05-05-2014

Accepted: 03-05-2017

Introduction: One of the most important requirements in planning production and processing of medicinal plants in order to obtain high yield and high-quality is the initial assessment of the physical and chemical properties of soil, which reduces the production cost by avoiding the use of unnecessary soil analysis. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) is one the most widely used medicinal plants that quality index of plant is related to the quantity and the constituent of its essential oil content. Understanding the relations between the quantity and quality of medicinal plants with the very physical and chemical properties of soil is very complex and the estimation of parameters changes of medicinal plants affect by soil quality characteristics is more difficult. Today, with the arrival of multivariable regression models and artificial lattice models in the research, many complex relationships found in nature is understandable. Hence the need for estimation the biomass yield of savory using fast, cheap and with acceptable accuracy is feeling.

Materials and Methods: The present study was performed at the Agricultural Research Station Neyshabur as pot experiment based on a completely randomized design with three replications. Around 53 soil samples were collected from different parts of Neyshabur city, and soil texture, organic matter, pH, salinity, phosphorus, potassium, nitrogen and carbon content were selected as the easily available parameters. Before planting the parameters were measured in laboratory. Approximately 90 days after planting seeds in pots containing soil samples, the sampling of plants was done based on the treatments. For drying, samples were placed for 24 hours in an oven at 40 °C. Finally, the relationship between the biomass yield and easily available soil parameters was determined using artificial neural network by Matlab7.9 software.

Results and Discussion: The results showed that soil variability, is a key element in the management of valuable information on soil properties within a field and valuable information on soil properties within a field nature puts at our disposal. In yield modeling with 10 parameters for 53 soil samples, the best makeup hidden layer with Levenberg-Marquardt algorithm training as a hidden layer, 58 neurons, logsig threshold function for hidden layer and Tansig for the output layer were selected. High values of R² and low levels of RMSE mentioned the proximity of the forecast data with measurement data and high accuracy of the model in summer savory biomass yield estimation. To obtain the most sensitive parameters, the sensitivity analysis was calculated using no-sensitive coefficient. So that, if the coefficient of a sensitive parameter is more than 1.0, the mentioned parameter, is one of the critical parameters of model. Accordingly, the parameters of organic carbon, nitrogen, phosphorus, organic matter, potassium, pH, salinity, clay, silt and sand respectively were selected as the most sensitive parameters. The addition of input parameters increases the value of R² and reduces the RMSE during training, validation and test stages. This represents an increasing in the accuracy of model in estimation of biomass yield via increasing the input parameters. Models 1(soil texture) and 2(carbon) are not enough strong for biomass yield estimation. With increasing the experiment from 1 to 2, the potency of the neural network model 3(soil texture + carbon) significantly increased. Thus with an overview, the model No. 3 suggested as an improved model because with the minimum number of imputes produced equal output comparing the models with more inputs.

Conclusions: Based on the obtained results, it seems that with the improvement of artificial neural network models and determining appropriate parameters, results to understanding the soil factors involved in the formation of savory plant biomass and better planning. Till leads to a cheaper and better product. Also, results showed that the artificial neural network has high accuracy in estimating the biomass plant Summer Savory. So that, the 80% of yield variability of the study area, presents by using the data of 10 readily available properties of the soil. Yield biomass of savory, largely depends on the soil texture, organic matter, carbon and the minerals of

1, 2 and 3- MSc, Assistant Professor and Associated Professor in Horticultural Sciences, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources

(*- Corresponding Author Email: Sabouri@tvu.ac.ir)

4- Assistant Professor in Hydrology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources

5- PhD student of Physiology, Ferdowsi University of Mashhad

6- MSc in Hydrology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources

the soil. Since, this study is the first work to estimate the biomass of medicinal plants using artificial neural network, therefore recommended to use this method to estimate the yield and essential oil of other medicinal plants.

Keywords: Summer savory, Artificial neural network, Easily accessible soil parameters



اثر کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم همراه با کود دامی بر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی میوه و برگ خرما (*Phoenix dactylifera* L.) رقم مضافتی

الیاس آریاکیا^{1*} - حمید رضا روستا² - ناهید رحیمی زاده³

تاریخ دریافت: 1393/04/18

تاریخ پذیرش: 1396/04/14

چکیده

با توجه به نیاز تغذیه‌ای بالای درخت خرما (*Phoenix dactylifera* L.)، لازم است تا اثر کودهای پر مصرف بر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی برگ و میوه آن مورد بررسی قرار گیرد. برای این منظور، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی شامل تیمار کودی سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم همراه با کود دامی به صورت چالکود در اسفند ماه و در منطقه بم اعمال گردید. نمونه‌برداری جهت آنالیز برگ و میوه، به ترتیب در خرداد ماه و برداشت محصول خرما انجام شد. نتایج نشان داد با توجه به تاثیر معنی‌دار عناصر نیتروژن، گوگرد و پتاسیم فراهم شده توسط کودهای مذکور بر شاخص‌های مورد نظر، بیشترین محتوای نیتروژن و آهن و رنگدانه‌های فتوسنتزی کاروتنوئید و کلروفیل (a و کل) برگ و وزن میوه خرما به ترتیب از اثر متقابل کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم همراه با کود دامی، به دست آمد. بیشترین محتوای پتاسیم در برگ، TSS و نسبت TSS/TA در میوه، از تیمارهای سولفات آمونیوم (500 گرم) و سولفات پتاسیم (1500 گرم) همراه با کود دامی حاصل شد. بنابراین به منظور بهبود شاخص‌های فیزیکوشیمیایی برگ و میوه درخت خرما، ترکیب کودی سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم همراه با کود دامی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رنگدانه‌های فتوسنتزی، تغذیه، مواد معدنی، TSS

مقدمه

کیفیت مناسب خرما لازم است تا سالانه کوددهی مناسب صورت پذیرد. عناصر نیتروژن، پتاسیم و گوگرد جزء عناصر پرمصرف می‌باشد که برای تغذیه گیاهان لازم و ضروری می‌باشند. نیتروژن مهمترین عنصر برای تغذیه و نمو گیاه محسوب می‌شود چراکه نقش مهمی در ترکیب پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و آنزیم‌ها دارد. فرم نیتروژنی که برای تغذیه گیاه به کار می‌رود، نقش مهمی در رشد و تولید گیاه ایفا می‌کند (44). آمونیوم، نترات و اوره، مهمترین اشکال مختلف نیتروژن هستند که برای تغذیه گیاهان به کار می‌روند (19). منابع مختلف نیتروژن ممکن است برای گونه‌های مختلف گیاهی تاثیر متفاوت داشته باشند. پتاسیم نیز عنصر حیاتی برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی همچون متابولیسم قند و نشاسته، فتوسنتز، توسعه سلول و در کل رشد نمو گیاه می‌باشد (63). پتاسیم نقش تغذیه‌ای مهمی در رشد و تولید گیاه خرما ایفا می‌کند (3). گوگرد نیز یکی دیگر از عمده‌ترین مواد تغذیه‌ای محدود کننده تولیدات کشاورزی می‌باشد (18) که در چند سال اخیر تمرکز زیادی روی کاربرد گوگرد برای کاهش خاصیت قلیایی خاک‌های آهکی بوده است (1). کودهای دامی نیز علاوه بر تامین عناصر پرمصرف و ریزمغذی در خاک، باعث اصلاح ساختار و بافت خاک می‌شوند. پژوهش‌های متعددی تاثیرات کودهای آلی و معدنی را بر روی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی میوه و برگ خرما

درخت خرما (*Phoenix dactylifera* L.) یکی از محصولات استراتژیک در کشور محسوب می‌شود. ایران در بین کشورهای تولید کننده خرما، از نظر سطح زیر کشت مقام اول و از نظر میزان تولید در مقام دوم جهانی جای دارد، لیکن به لحاظ عملکرد در هکتار در ردیف هفتم از بین پانزده کشور تولیدکننده عمده این محصول قرار دارد (5). این محصول باغی عمدتاً در جنوب کشور تولید می‌شود که خاک آنها دارای pH بالایی بوده و در نتیجه فرم قابل جذب عناصر غذایی در آنها کم می‌باشد. همچنین گزارش شده است که مقادیر زیادی از عناصر پرمصرف و ریزمغذی، سالانه در اثر عملکرد بالا و هرس برگ خرما از خاک حذف می‌شود (17). لذا به منظور حفظ عملکرد بالا و

1- عضو هیات علمی، بانک گیاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) جهاد دانشگاهی (ACECR)

(*) - نویسنده مسئول: (Email: aryakia@ibrc.ir)

2- استاد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

3- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت

مواد و روش‌ها

مشخصات مکان، آب و خاک محل آزمایش

این آزمایش در سال 1390 در شهرستان بم با طول جغرافیایی $28^{\circ}53'40''$ و عرض جغرافیایی $58^{\circ}37'18''$ و متوسط ارتفاع 1050 متر از سطح دریا انجام شد. متوسط بارندگی سالیانه 64 میلی‌متر، متوسط درجه حرارت $23/8$ درجه سلسیوس و میانگین سالیانه تبخیر با تشتک تبخیر کلاس A، 3000 میلی‌متر می‌باشد. این مرکز دارای رژیم رطوبتی (زریک) Xeric و خاک تحتانی متوسط (شن - سیلت و لوم) بود. مشخصات آب و خاک محل آزمایش در جداول 1، 2 و 3 ذکر شده است.

بررسی کرده‌اند (16، 24، 31 و 47). تحقیقات نشان می‌دهد که کاربرد کودهای دامی به تنهایی و یا در ترکیب با کودهای معدنی NPK شاخص‌های فیزیکی‌شیمیایی برگ و میوه درخت خرما را بهبود می‌بخشد (32). با توجه به اهمیت سه عنصر نیتروژن، پتاسیم و گوگرد در تغذیه گیاهان، هدف از این پژوهش، مطالعه اثر کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم (به عنوان منابع تامین کننده نیتروژن، پتاسیم و گوگرد) در ترکیب با کود دامی، بر شاخص‌های فیزیکی‌شیمیایی برگ و میوه خرما در منطقه بم می‌باشد.

جدول 1- ویژگی آب آبیاری نخلستان

Table 1- Characteristics the irrigation water of date orchard

Na ⁺ (meq/l)	Mg ²⁺ (meq/l)	Ca ²⁺ (meq/l)	SO ₄ ²⁻ (meq/l)	Cl ⁻ (meq/l)	HCO ₃ ⁻ (meq/l)	CO ₃ ²⁻ (meq/l)	EC(ds/m)	pH
11.2	2.12	4.66	4.02	11.2	2.8	0	1.873	7.7

جدول 2- ویژگی خاک نخلستان محل آزمایش

Table 2- Characteristics the soil of date orchard

بافت خاک Soil texture	پتاسیم قابل جذب potassium (mg/kg)	فسفر قابل جذب phosphor (mg/kg)	کربن آلی Organic carbon (%)	CaSO ₄ 2H ₂ O (me/100g)	pH اسیدیته گل اشباع pH of saturated mud	EC (ds/m)	بر boron (ppm)	عمق Depth (cm)
شنی لومی Sandy- loam	98	4	0.14	16.45	8.1	1	0	0-30
شنی لومی Sandy- loam	30	4	0.13	12	8.1	1	2.4	30-60
شنی لومی Sandy- loam	70	4	0.13	12.01	8.1	1	2.88	60-90

جدول 3- ویژگی عناصر غذایی خاک نخلستان

Table 3- Characteristics the soil nutrient of date orchard

Cd	Pb	Fe	Mn	Cu	Zn	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na +	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	عمق Depth (cm)
ppm					meq/L							
0.013	0.32	1.24	2.03	5.92	0.36	2.4	4.4	6.7	2.8	6	48.7	
0.0015	0	1.04	1.84	5.12	0.22	1.2	3.2	6.4	3.6	6.8	1.1	
0	0.11	0.96	1.63	5.28	0.39	3.1	0.3	8.7	2.4	5.2	4.4	

مشخصات طرح آزمایشی

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول کود سولفات آمونیوم در سه سطح (0، 500 و 1000 گرم به ازای هر درخت) و فاکتور دوم کود سولفات پتاسیم در سه سطح (شامل 0، 750 و 1500 گرم به ازای هر درخت) بودند که همراه با 5 کیلوگرم کود دامی به صورت چالکود در اسفند ماه در درختان خرما مضافتی اعمال گردیدند. در باغ انتخابی

تعداد 27 درخت انتخاب شد. در هر کرت 9 عدد درخت متوسط و یکسان جهت اعمال تیمار علامتگذاری گردید. نمونه برداری صفات جهت تجزیه برگی در خرداد ماه و جهت وزن میوه در برداشت دوم خرما از 27 درخت و در هر درخت از 3 خوشه به صورت تصادفی انجام گرفت. از هر درخت تعداد 200 میوه برداشت و پارامترهایی همچون میزان نیتروژن (توسط دستگاه کج‌لدال)، پتاسیم (توسط دستگاه فتومتر شعله‌ای (شرکت آلمانی، مدل JENWAY، PFP7)، آهن

آنالیز داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری کلیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح آماری 5 درصد یا 1 درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

عناصر معدنی برگ

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول 4) نشان داد که اثر متقابل کود سولفات آمونیوم و کود سولفات پتاسیم بر میزان نیتروژن و آهن در برگ درخت خرما در سطح 1 درصد معنی‌دار بود. ترکیب کودی سولفات آمونیوم (1000 گرم) و سولفات پتاسیم (1500 گرم) بعلاوه کود دامی، بطور بسیار معنی‌دار و در سطح آماری 1 درصد، میزان نیتروژن و آهن را افزایش داد (جدول 5) و تیمار کودی سولفات آمونیوم (500 گرم) و سولفات پتاسیم (1500 گرم) بعلاوه کود دامی، بطور بسیار معنی‌دار و در سطح آماری 1 درصد، میزان پتاسیم را افزایش داد. تیمار شاهد (کود دامی به تنهایی) تاثیر معنی‌داری بر محتوای پتاسیم نداشت (جدول 6).

گزارش‌های زیادی از تاثیر کاربرد کودهای معدنی بر میزان غلظت عناصر (نیتروژن، پتاسیم و آهن) بافت گیاه وجود دارد؛ گیاهان تیمار شده با نیترات آمونیوم در ترکیب با نیتروبین (نوعی کود زیستی)، در هر دو رقم خرما زاقلول و سمایی و در دو سال متوالی، بیشترین میزان نیتروژن و پتاسیم برگ را در مقایسه با شاهد، داشته است (16). در طی دو سال متوالی، بالاترین میزان نیتروژن، آهن و پتاسیم در میوه خرما از تیمار کود دامی در ترکیب با مواد معدنی NPK به دست آمد (32). همچنین کاربرد کود نیتروژن به شکل اوره، در تمام غلظت‌ها به ویژه غلظت 1000 گرم اوره به ازای هر درخت، غلظت نیتروژن، آهن و پتاسیم را در برگ‌های درخت خرما افزایش داد (47). کاربرد کود سولفات آمونیوم نیز باعث افزایش غلظت نیتروژن، آهن و پتاسیم برگ درخت خرما (24) و پسته (36) شد. گزارش شده است که با افزایش غلظت کود سولفات پتاسیم غلظت نیتروژن و پتاسیم برگ پیاز نیز افزایش یافته است (37 و 14).

گزارش‌های مذکور حاکی از آن است که کاربرد کودهای نیتروژنی باعث افزایش غلظت نیتروژن در برگ گیاهان می‌شود، مخصوصا استفاده از آمونیوم غلظت نیتروژن برگ را نسبت به نیترات بیشتر افزایش می‌دهد (44). در مرکبات مشاهده شده است که تغذیه با آمونیوم منجر به افزایش غلظت نیتروژن برگ نسبت به گیاهان تغذیه شده با نیترات می‌شود (48). نتایج مشابهی در تغذیه خیار با آمونیوم و نیترات به دست آمد (42). کاربرد کود سولفات آمونیوم در گیاه اسفناج نشان داد در مقایسه با شاهد، میزان تجمع نیتروژن را به شکل نیترات، هم در پهنک و هم در دم‌برگ چند برابر افزایش داد

توسط دستگاه جذب اتمی (شرکت استرالیایی، AvantaVersion GBC 33/1)، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید، وزن میوه، وزن هسته، قطرمیوه، طول میوه، TSS، و نسبت TSS/TA اندازه‌گیری شد.

میزان مواد جامد محلول (TSS) میوه‌ها با استفاده از دستگاه رفاکتومتر اندازه‌گیری شد. برای این منظور چند قطره از عصاره آب میوه بر روی سطح شیشه رفاکتومتر قرار داده شد و پس از تنظیم دستگاه عدد مربوطه قرائت و یادداشت گردید.

برای اندازه‌گیری میزان اسید کل میوه از روش تیتراسیون استفاده شد. برای این منظور 10 میلی‌لیتر آب میوه داخل ارلن ریخته شد و 60 میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و پس از اضافه نمودن چند قطره فتل‌فتالین (1 درصد در الکل) به عنوان شناساگر، با سود (هیدروکسید سدیم) 0/1 نرمال تیتر شد. اسیدیته قابل تیتراسیون با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردیده و مقدار عددی آن بر حسب درصد اسید سیتریک بیان شد.

$$C = (N \cdot V_b \cdot E / V_j) 100$$

C = اسید کل بر حسب میلی‌گرم در 100 سی سی

N = نرمالیه سود مصرفی

V_b = حجم سود مصرفی (میلی لیتر)

E = وزن اکی‌والان اسید سیتریک (70)

V_j = حجم نمونه آب میوه

برای بدست آوردن درصد اسید سیتریک (گرم اسید در 100 سی -

سی آب میوه) عدد بدست آمده در 0/001 ضرب می‌شد.

سنجش میزان کلروفیل

برای سنجش میزان کلروفیل و کارتنوئید از روش لیچتندر (27) استفاده شد. 0/1 گرم از برگ جوان بالغ به دقت توزین شد، سپس در هاون چینی با 10 میلی لیتر استون 80 درصد به خوبی ساییده و پس از صاف کردن به لوله آزمایش منتقل شدند. محلول فوق دارای کلروفیل‌های a و b، کارتنوئیدها و گزانتوفیل‌ها می‌باشد. در ادامه با استفاده از اسپکتروفتومتری UV-VIS مدل 7220G، جذب محلول در طول موج‌های 470، 647 و 663 نانومتر اندازه‌گیری شد و از استون 80 درصد نیز به عنوان محلول شاهد برای تنظیم صفر جذب نوری اسپکتروفتومتر استفاده شد. برای انجام محاسبات مربوط به تعیین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئیدها (گزانتوفیل و بتاکاروتن) بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاهی به ترتیب از روابط زیر استفاده شد:

$$Chl_a = 12/25A_{663} - 2/79A_{647}$$

$$Chl_b = 21/50A_{647} - 5/10A_{663}$$

$$C(x+c) = (1000A_{470} \cdot 1/82 \cdot Chl_a - 85/02 \cdot Chl_b) / 198$$

(15). گوگرد نیز عنصر حیاتی تشکیل دهنده آنزیم‌های دخیل در آسمیلاسیون نیتروژن می‌باشد و دسترسی بیشتر به آن، آسمیلاسیون نیتروژن را افزایش می‌دهد (52). کود سولفات آمونیوم به کار رفته در این پژوهش، نیتروژن آمونیومی و گوگرد را برای گیاه فراهم می‌کند، که با توجه به نتایج فوق، میزان نیتروژن برگ را افزایش می‌دهند. آهن از جمله دیگر عناصر حیاتی رشد نمو گیاه محسوب می‌شود. آهن می‌تواند به‌طور مستقیم در آپوپلاست ریشه یا در روی سطح ریشه با پی اچ بالا رسوب کند که منجر به محتوی بالای آهن در ریشه‌های گیاهان تغذیه شده با نیترات می‌شود (30). این پدیده در منطقه بم با پی اچ بالای آب و خاک دور از انتظار نیست. وجود نیتروژن در خاک باعث می‌شود تا پی اچ سطح ریشه کاهش یافته و نهایتاً آهن از سطح ریشه جذب و در ادامه به راحتی در گیاه منتقل شود (2 و 32). افزودن کود سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم واکنش‌های اسیدی در خاک را به دنبال دارند (5، 8 و 19) که این می‌تواند به ویژگی خاک منطقه مورد آزمایش ما با پی اچ بالا (جدول 2)، منطبق باشد و با کاهش پی اچ خاک، دسترسی و جذب گیاهان به عناصر را در خاک‌های قلیایی افزایش دهد. پتاسیم نیز با تأثیری که بر میزان اسیدی شدن محیط ریزوسفر دارد، بر جذب آهن و کاهش کلروز آهن نقش دارد (22، 23 و 59). لذا کاربرد کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در این منطقه، کارایی تجمع آهن در برگ درخت خرما را افزایش می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که نیتروژن، محتوای پتاسیم برگ را افزایش می‌دهد (50 و 54). با این وجود جذب بالای پتاسیم نمی‌تواند

ناشی از تأثیر مستقیم آمونیوم باشد چرا که آمونیوم در کل به دلیل رقابت یونی از جذب پتاسیم ممانعت می‌کند (46). از طرفی افزایش جریان یون اسیدی، خروج پتاسیم خاک را از طریق آبشویی بیشتر می‌کند. آمونیوم ممکن است از سیستم انتقال پتاسیم استفاده کند. آمونیوم به انتقال دهنده پتاسیم وصل شده و باعث تغییر شکل آن می‌شود (43). گزارش شده است که کاربرد آمونیوم جذب پتاسیم را کاهش می‌دهد (42). تغذیه مرکبات با آمونیوم نیز سبب کاهش جذب کاتیون‌هایی مانند پتاسیم شده است (48). این با نتایجی که بر روی کرچک (56) و گندم (60) بدست آمده که آمونیوم بازدارنده قوی جذب پتاسیم است مطابقت دارد. در این پژوهش نیز غلظت 500 گرم سولفات آمونیوم نسبت به شاهد، غلظت پتاسیم برگ را افزایش داد ولی در غلظت دو برابری (1000 گرم) تغییری در جذب پتاسیم حاصل نشد. مکانیسمی احتمالی که در آن افزودن نیتروژن باعث افزایش جذب پتاسیم می‌شود، ناشی از میکوریزا و ترشحات ریشه می‌باشد (45).

کاربرد توام کودهای معدنی به همراه کودهای دامی می‌تواند دسترسی به عناصر غذایی خاک را افزایش دهد (13، 21 و 29) و از آنجا که کودهای به کار رفته در این پژوهش (سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم و کود دامی) حاوی عناصر مهم به ویژه گوگرد، نیتروژن و پتاسیم می‌باشد، این نتایج با یافته‌های ما مبنی بر اثر افزایشی تجمع نیتروژن، پتاسیم و آهن در برگ درخت خرما در اثر کاربرد کودهای سولفات پتاسیم و سولفات آمونیوم به همراه کود دامی مطابقت دارد.

جدول 4- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده در درخت خرما رقم مضافتی
Table 4- The analysis of variance of date palm cv. Mazafati characters
Means of Squares

S.O.V	DF	وزن میوه Fruit weight	طول میوه Fruit lenght	قطر میوه Fruit diameter	TSS	TSS/TA	N	K	Fe	وزن هسته Kernel weight
تکرار Block	2	0.45ns	0.05ns	0.014ns	3.69ns	0.03ns	0.0001ns	0.004ns	13.77ns	0.0013ns
سولفات آمونیوم (A) Ammonium sulfate	2	42.78**	1.79ns	0.16ns	6.08**	57.81**	1.005**	0.012**	165.33**	0.43ns
سولفات پتاسیم (B) Potassium sulfate	2	24.08**	1.34ns	0.39ns	20.36**	51.59**	0.176**	0.41**	213.77**	0.176ns
A×B	4	6.76*	0.31ns	0.052ns	1.98ns	6.92ns	0.025**	0.0008ns	15.11**	0.017ns
خطا error	16	2.06	0.06	0.011	1.43	3.99	0.003	0.001	2.73	0.03
CV%	-	9.90	6.99	9.12	6.17	5.61	7.60	5.68	12.23	11.19

ادامه جدول 4
Table 4- continued

S.O.V	DF	Means of Squares			
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Chlorophyll total	کاروتنوئید Carotenoid
تکرار Block	2	0.08ns	0.025ns	0.33ns	0.003ns
سولفات آمونیوم (A) Ammonium sulfate	2	3.51**	0.65*	6.73*	0.59**
سولفات پتاسیم (B) Potassium sulfate	2	2.73**	0.27**	5.49**	0.37**
A × B	4	0.38**	0.01ns	0.42**	0.10*
خطا error	16	0.042	0.02	0.023	0.04
CV%	-	6.47	14.00	13.92	17.25

علامت‌های ns ، * و ** به ترتیب معرف غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح 5 درصد و معنی‌دار در سطح 1 درصد
ns, * and ** represent nonsignificant, significant at P = 0.05 and 0.01, respectively

محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول 4) نشان داد که اثرات ساده و متقابل کود سولفات آمونیوم و کود سولفات پتاسیم بر رنگدانه‌های فتوسنتزی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و میزان کارتنوئید در برگ درخت خرما، به جز اثر متقابل آنها بر محتوای

کلروفیل b، در سطح 5 درصد معنی‌دار بود. ترکیب کودی 500 گرم سولفات آمونیوم و 1500 گرم سولفات پتاسیم، بطور معنی‌دار و در سطح آماری 5 درصد، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید) را افزایش داد (جدول 5).

جدول 5- اثر متقابل کود سولفات آمونیوم × کود سولفات پتاسیم بر میزان نیتروژن، وزن میوه، آهن، کارتنوئید، کلروفیل a و کلروفیل کل در برگ خرما رقم مضافتی

Table 5- Interaction effect of ammonium sulfate and potassium sulfate interact on N, Fe, fruit weight, carotenoid, chlorophyll and total of date palm cv. Mazafati leaves

سولفات پتاسیم Potassium sulfate (gr)	سولفات آمونیوم Ammonium sulfate (gr)								
	0			500			1000		
	0	750	1500	0	750	1500	0	750	1500
نیتروژن (%) Nitrogen	0.83 ^f	0.95 ^e	0.93 ^e	1.05 ^d	1.3 ^{cd}	1.51 ^b	1.43 ^c	1.57 ^b	1.7 ^a
وزن میوه Fruit weight (g)	9.67 ^d	14.33 ^c	15.83 ^{bc}	16 ^b	16.67 ^b	18.17 ^a	16.17 ^b	18.13 ^a	17.17 ^{ab}
آهن Iron (mg/g dw)	122.67 ^c	130.67 ^{bc}	133 ^b	132.67 ^b	136 ^{ab}	137.67 ^{ab}	129 ^{bc}	140.33 ^a	141 ^a
کاروتنوئید Carotenoid (mg/g fw)	0.77 ^e	0.98 ^e	0.88 ^{de}	1 ^d	1.27 ^c	1.27 ^a	1.08 ^d	1.41 ^b	1.4 ^b
کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g fw)	2.17 ^d	2.52 ^{cd}	2.82 ^c	2.92 ^c	3.32 ^{bc}	4.33 ^a	2.8 ^c	4.11 ^{ab}	4 ^b
کلروفیل کل Chlorophyll total (mg/g fw)	2.77 ^e	3.3 ^d	3.76 ^{cd}	3.58 ^c	4.52 ^b	5.56 ^a	3.83 ^c	5.48 ^{ab}	5.46 ^a

حروف متفاوت در روی ستون‌ها نشانه معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال 1 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد
Different letters (a-f) indicate significant differences (P < 0.01) based on Duncan's multiple range test

جدول 6- مقایسه میانگین اثر کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم بر محتوای پتاسیم، TSS، کرومیل B و TSS/TA در خرما رقم مضافتی
Table 6- comparison of means for the effect of ammonium sulfate and potassium sulfate on potassium, TSS, TSS/TA and chlorophyll b content of date palm cv. Mazafati

	سولفات آمونیوم			سولفات پتاسیم		
	Ammonium sulfate			Potassium sulfate		
	(g)			(g)		
	0	500	1000	0	750	1500
TSS (%)	18.83 ^b	20.33 ^a	19 ^a	17.67 ^b	20.44 ^a	20.06 ^a
TSS/TA (%)	32.67 ^b	37.11 ^a	37 ^a	32.89 ^b	36.44 ^a	37.44 ^a
پتاسیم Potassium (%)	0.6 ^b	0.7 ^a	0.7 ^a	0.43 ^c	0.78 ^b	0.92 ^a
کرومیل b Chlorophyll b (mg/g fw)	0.77 ^b	1.15 ^a	1.3 ^a	0.88 ^b	1.13 ^a	1.21 ^a

حروف متفاوت در روی ستون‌ها نشانه معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال 1 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد

Different letters (a-c) indicate significant differences ($P < 0.01$) based on Duncan's multiple range test

افزایش می‌دهد که احتمالاً به دلیل نقش پتاسیم در جذب مواد غذایی همچون آهن و منیزیم و گوگرد است که در سنتز کلروفیل نقش دارند (6). افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ خرما با استفاده از هر دو کود سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم، احتمالاً به ترکیبات معدنی موجود در آن به ویژه گوگرد و نیتروژن و نقش آنها در سنتز این ترکیبات، بستگی دارد. با توجه به نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت از ترکیب کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم می‌توان برای افزایش اجزای فعال فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئید برگ) در منطقه خشک با پی اچ بالا، استفاده نمود.

میزان TSS و نسبت TSS/TA در میوه

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول 4) نشان داد که اثرات کودهای سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در ترکیب با کود دامی بر میزان TSS و نسبت TSS/TA در میوه درخت خرما در سطح 1 درصد معنی‌دار بود. ترکیب کودی سولفات آمونیوم (500 گرم) و سولفات پتاسیم (750 گرم) به ازای هر درخت، بطور معنی‌دار و در سطح آماری 1 درصد، میزان TSS و نسبت TSS/TA را افزایش داد. تیمار کود دامی به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های مذکور نداشت (جدول 6).

گزارش شده است کود سولفات آمونیوم در مقایسه با کود نیترات آمونیوم و اوره میزان TSS میوه خرما را افزایش می‌دهد (31). گیاهان تیمار شده با نیترات آمونیوم در ترکیب با نیتروژن، در هر دو رقم خرما زاقلول و سمانی و در دو سال متوالی، بیشترین میزان محتوای قند میوه را در مقایسه با شاهد، داشته است (16). همچنین در طی دو سال متوالی بالاترین میزان TSS در میوه خرما از تیمار کود دامی به تنهایی و یا در ترکیب با مواد معدنی NPK به دست آمد ولی میزان TA تغییری نکرد (32). کود نیتروژن نیز به شکل اوره، میزان TSS میوه خرما را در مقایسه با شاهد افزایش داد (47). همچنین کاربرد

کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها ترکیبات آبدوستی هستند که در اندامک‌های خاصی همچون کلروپلاست و کروموپلاست سلول گیاهی سنتز و اندوخته می‌شوند. در گیاهان سبز، کاروتنوئیدها در کلروپلاست بافتهای سبز یافت می‌شوند درحالی‌که رنگ آنها، به دلیل حضور غالب کلروفیل، مستور می‌باشد. کاروتنوئیدها از طرق مختلف در فتوسنتز نقش دارند و با مولکول کلروفیل ارتباط مستقیم دارند؛ از جمله اینکه هم در فرایند انتقال انرژی به کلروفیل و هم در حفاظت نوری و جلوگیری از خسارت اکسیداتیو به کلروفیل نقش ایفا می‌کنند. در شرایط طبیعی نیز به ازای هر 3-4 مولکول کلروفیل یک مولکول کاروتنوئید وجود دارد و رابطه مثبتی بین مقدار کلروفیل و کاروتنوئید در بافت فعال فتوسنتزی وجود دارد (5، 12، 51، 53 و 61). محتوای بیشتر کلروفیل و کاروتنوئید، توانایی جذب و انتقال انرژی را در گیاه افزایش می‌دهد. گزارش شده است محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید در گیاهان تغذیه شده با نیتروژن، به خصوص نیتروژن آمونیومی بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد (42). کاربرد کودهای حاوی نیتروژن، پتاسیم و فسفر و ترکیب آنها، نیز در مقایسه با شاهد، محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید را در گیاهان خردل (51) و گندم (8) افزایش داد. شاخص کلروفیل در برگ پیاز با تیمار کودهای نیترات آمونیوم و سولفات پتاسیم افزایش یافت (37). نتایج مذکور حاکی از تأثیر سه عنصر نیتروژن، گوگرد و پتاسیم است که در اثر کودهای سولفات پتاسیم و سولفات آمونیوم به کار رفته در این پژوهش، نیز در اختیار گیاه قرار می‌گیرد و هر یک از این عناصر می‌توانند مقدار کلروفیل و کاروتنوئید برگ را تحت تأثیر قرار دهند. نقش نیتروژن و گوگرد در ترکیب کلروفیل گیاهان اثبات شده است (40، 41 و 49) به طوریکه در هر مولکول کلروفیل، چهار مولکول نیتروژن در حلقه تتراپیرول وجود دارد. از طرف دیگر غلظت کلروفیل ارتباط مثبتی با آهن، کلسیم و منیزیم و ارتباط منفی با پتاسیم برگ دارد (7)، با این وجود گزارش شده است که پتاسیم نیز شاخص محتوای کلروفیل را

میوه را افزایش داد. تیمار کود دامی به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر وزن میوه نداشت (جدول 5).

گزارش شده است کود سولفات آمونیوم در مقایسه با کود نیترات آمونیوم و اوره، طول و وزن میوه خرما را افزایش می‌دهد (24 و 31) و در طی دو سال متوالی، بالاترین میزان وزن میوه خرما از تیمار کود دامی به تنهایی و یا در ترکیب با مواد معدنی NPK به دست آمد (32). گیاهان تیمار شده با نیترات آمونیوم در ترکیب با نیتروبین، در هر دو رقم خرما زاقول و سماني و در دو سال متوالی، بیشترین میزان وزن میوه را در مقایسه با شاهد، داشته است (16). کود نیتروژن نیز به شکل اوره، وزن میوه خرما را در مقایسه با شاهد افزایش داد (47). در مقایسه با شاهد، کود سولفات پتاسیم بیشتر از اوره، وزن میوه خرما را افزایش داد (25). در گیاه آناناس نیز نتایج نشان داد کاربرد کودهای نیتروژن و پتاسیم، به تنهایی و یا در ترکیب باهم، در مقایسه با شاهد، وزن میوه را به شدت افزایش داد (38). کاربرد توام کودهای معدنی به همراه کودهای دامی می‌تواند دسترسی به عناصر غذایی خاک را افزایش دهد (13، 21 و 29) و از آنجا که کودهای به کار رفته در این پژوهش (سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم و کود دامی) حاوی عناصر مهم به ویژه گوگرد و نیتروژن می‌باشد، افزایش معنی‌دار وزن میوه خرما می‌تواند ناشی از فراهم شدن مقادیر کافی عناصر نیتروژن، گوگرد و پتاسیم دسترس خاک باشد که در این پژوهش به طور مستقیم روی شاخصه‌های فیزیوشیمیایی برگ خرما (کاروتنوئید، کلروفیل، محتوای نیتروژن، پتاسیم و آهن) تاثیر مثبت داشته و همانطور که جدول همبستگی صفات نشان می‌دهد (جدول 7)، وزن، TSS و نسبت TSS/TA میوه خرما را افزایش می‌دهند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد کود دامی (نمونه شاهد) به تنهایی برای برای تغذیه درخت خرما کافی نیست و همراه آن، استفاده از کودهای سولفات پتاسیم و سولفات آمونیوم به تنهایی و یا در ترکیب با هم، باعث بهبود خواص فیزیوشیمیایی برگ و میوه درخت خرما می‌شود. این ترکیب کودی، تامین کننده عناصر نیتروژن، پتاسیم و گوگرد می‌باشد که جزء عناصر پر مصرف گیاه هستند و با توجه به تاثیر معنی‌دار آنها بر شاخص‌های فیزیوشیمیایی مورد نظر در این پژوهش، محتوای نیتروژن، آهن و پتاسیم و رنگدانه‌های فتوسنتزی کاروتنوئید و کلروفیل (a و کل) برگ و محتوای TSS و نسبت TSS/TA و وزن میوه خرما بهبود پیدا کرد.

کود سولفات آمونیوم به تنهایی میزان TSS را افزایش ولی میزان TA میوه خرما را کاهش می‌دهد (24) که با نتایج ما مبنی بر افزایش TSS و نسبت TSS/TA در میوه خرما تحت تاثیر تیمار کودی سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم در ترکیب با کود دامی مطابقت دارد. میزان TA نیز با کاربرد مواد معدنی، همراه یا بدون استفاده از مواد آلی افزایش پیدا کرد، با این حال، مقدار TSS و TA به ویژگی‌های رقم و مرحله رشدی بستگی دارد (3). نتایج مذکور حاکی از تاثیر سه عنصر نیتروژن، گوگرد و پتاسیم است که در اثر کاربرد کودهای سولفات پتاسیم و سولفات آمونیوم به کار رفته در این پژوهش، نیز در اختیار گیاه قرار گرفته است و هر یک از این عناصر می‌توانند مقدار TSS و TA میوه را تحت تاثیر قرار دهند. کاربرد کود سولفات پتاسیم میزان TSS را در میوه گوجه‌فرنگی افزایش داد (28). نتایج مشابهی از محلول‌پاشی برگی با پتاسیم، غلظت TSS را در میوه نوعی خربزه (muskmelon) (26) و بر اساس مونو فسفات پتاسیم در میوه گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای حاصل شد (9). هر دو عنصر نیتروژن و پتاسیم، در مقایسه با شاهد، محتوای TSS را در آناناس افزایش دادند ولی تاثیر پتاسیم بیشتر از نیتروژن بود (38). افزایش غلظت پتاسیم برگ، سرعت فتوسنتزی کلروپلاست را افزایش می‌دهد (11)، سرعت انتقال مواد فتوسنتزی از برگ به بافت ذخیره‌ای از طریق آوند آبکش افزایش یافته (4 و 34) و از این طریق کیفیت و عملکرد میوه را بهبود می‌یابد (20) که با محتوای بالای قند در میوه ارتباط دارد (26 و 39). مقدار ناکافی یا بیش از حد پتاسیم به طور نامناسبی کیفیت میوه را در پسته (62) تحت تاثیر قرار داد (55). غلظت بهینه نیتروژن، مقدار TSS و TA را در میوه muskmelon افزایش داد (10). نیتروژن می‌تواند مقدار مواد جامد قابل حل (Brix) در میوه درخت خرما را افزایش دهد، با این حال این افزایش می‌تواند ترتیب منظمی نداشته باشد به طوریکه در غلظت 700 گرم نیتروژن به شکل اوره به ازای هر درخت، بیشترین اثر را در افزایش Brix در میوه خرما داشته است (47). افزودن کود سولفات آمونیوم و سولفات پتاسیم واکنش‌های اسیدی در خاک را به دنبال دارند (19، 35 و 58) که این می‌تواند به ویژگی خاک منطقه مورد آزمایش ما با پی اچ بالا، منطبق باشد و با کاهش پی اچ خاک، دسترسی و جذب گیاهان به عناصر را در خاکهای قلیایی افزایش دهد.

وزن میوه

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول 4) نشان داد که اثر متقابل کود سولفات آمونیوم و کود سولفات پتاسیم بر وزن میوه در درخت خرما در سطح 1 درصد معنی‌دار بود. ترکیب کودی سولفات آمونیوم 500 گرم به ازای هر درخت و سولفات پتاسیم 1500 گرم به ازای هر درخت، بطور بسیار معنی‌دار و در سطح آماری 1 درصد، وزن

جدول 7- همبستگی صفات اندازه‌گیری شده در خرما رقم مضافتی

Table 7- Correlation between characters of date palm cv. Mazafati

Pearson Correlation Coefficients, N = 27										
	وزن میوه Fruit weight	TSS	TSS/TA	N	K	Fe	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Chlorophyll total	کاروتنوئید Carotenoid
وزن میوه Fruit weight	1.00									
TSS	0.56**	1.00								
TSS/TA	0.75**	0.63**	1.00							
N	0.72**	0.33**	0.68**	1.00						
K	0.60**	0.69**	0.63**	0.47**	1.00					
Fe	0.76**	0.54**	0.77**	0.73**	0.79**	1.00				
کلروفیل a Chlorophyll a	0.74**	0.53**	0.76**	0.83**	0.67**	0.84**	1.00			
کلروفیل b Chlorophyll b	0.70**	0.36**	0.73**	0.83**	0.55**	0.82**	0.82**	1.00		
کلروفیل کل Chlorophyll total	0.74**	0.56**	0.83**	0.87**	0.70**	0.88**	0.96**	0.90**	1.00	
کاروتنوئید Carotenoid	0.55**	0.42**	0.70**	0.72**	0.53**	0.65**	0.79**	0.78**	0.8**	1.00

علامت‌های ns، * و ** به ترتیب معرف غیر معنی دار، معنی دار در سطح 5 درصد و معنی دار در سطح 1 درصد
ns، * and ** represent nonsignificant, significant at P = 0.05 and 0.01, respectively.

منابع

- Abbey L., Joyce D.C., Aked J. and Smith B. 2002. Genotype, sulphur nutrition and soil type effects on growth and dry-matter production of spring onion. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(3): 340-345.
- Aciksoz S.B., Ozturk L., Gokmen O.O., Römhelt V., and Cakmak I. 2011. Effect of nitrogen on root release of phytosiderophores and root uptake of Fe (III)-phytosiderophore in Fe-deficient wheat plants. *Physiologia Plantarum*, 142 (3): 287-96.
- Al-Kharusi L.M., Elmardi M.O., Ali A., Al-Julanda F., Al-Said L., Abdelbasit K., and Al-Rawahy S. 2009. Effect of mineral and organic fertilizers on the chemical characteristics and quality of date fruit. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 1560– 8530.
- Ashley D.A., and Goodson R.D. 1972. Effect of time and plant K status on ¹⁴C-labeled photosynthate movement in cotton. *Crop Science*, 12: 686–690.
- Azizi J., and yazdani S. 2007. Investigation stability income of export date of Iran. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(1): 1-17.
- Bark P., and Chein Y. 1983. Effect of potassium fertilization on iron deficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 14: 945-950.
- Bavaresco L., Giachino E., and Colla R. 1999. Iron chlorosis paradox in grapevine. *Journal of Plant Nutrition*, 22(10): 1589–1597.
- Bojovic B., and stojanovic J. 2005. Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Science Belgrade*, 57(4): 283-290.
- Chapagain B.P., and Wiesman Z. 2004. Effect of Nutri-Vant-PeaK foliar spray on plant development, yield, and fruit quality in greenhouse tomatoes. *Horticultural Science*, 102: 177–188.
- De Queiroga R.C.F., Puiatti M., Fontes P.C.R., Cecon P.R., and Finger F.L. 2007. Yield and quality of muskmelon fruits cultivated in greenhouse with doses of nitrogen. *Horticultura Brasileira*, 25(4): 550–556.
- Dekov I., and Velichkov D. 1992. Ultrastructural and functional changes in the chloroplasts of maize plants at various levels of potassium nutrition and water stress. *Plant Physiology*, 18(1): 3–9.
- Delgado-Pelayo R., Gallardo-Guerrero L., and Hornero-Méndez D. 2014. Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*. (in press)
- Eghball B., Wienhold B.J., Gilley J.E., and Eigenberg R.A. 2002. Mineralization of manure nutrients. *Journal of Soil and Water Conservation*, 57(6): 470-473.
- EL-Desuki M., Abdel-Mouty M.M., and Ali A.H. 2006. Response of onion plants to additional dose of potassium application. *Journal of Applied Science Research*, 2(9): 592-597.
- Elia A., Santamaria P., and Serio F. 1998. Nitrogen Nutrition, Yield and Quality of Spinach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(3): 341-346.

- 16- Elkhayat H.M., and Elnoam S.M. 2013. The Use of Biofertilizer to Enhance Fruit Quality and Productivity Zaghloul and Samani Date Palms. Alexandria Journal of Agricultural Research, 58(2): 131-140.
- 17- El-Shurafa M. 1984. Annual loss of minerals from date palm. Date Palm Journal, 3: 278-290.
- 18- Eriksen J., Thorup-Kristensen K., and Askegard M. 2004. Plant availability of catch crop sulfur following spring incorporation. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 167: 609-615.
- 19- Guelser F. 2005. Effects of ammonium sulfate and urea on NO₃⁻ and NO₂⁻ accumulation, nutrient contents and yield criteria in spinach. Scientia Horticulturae, 106: 330-340.
- 20- Hartz H.K., Miyao G., and Mullen R.J. 1999. Potassium requirements for maximum yield and fruit quality of processing tomato. Journal of the American Society for Horticultural Science, 124(2): 199-204.
- 21- Haynes R.J., and Naidu R. 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 51(2): 123-137.
- 22- Hughes D. F., Jolley V. D., and Brown J. C. 1992. Roles for potassium in the iron-stress response mechanisms of strategy I and strategy II plants. Journal of Plant Nutrition, 15(10): 1821-1839.
- 23- Jolley V.D., Fairbanks D.J., Stevens W.B., Terry R.E., and Orf J. H. 1992. Root iron-reduction capacity for genotypic evaluation of iron efficiency in soybean. Journal of Plant Nutrition, 15(10): 1679-1690.
- 24- Kassem H. A. 2012. The response of date palm to calcareous soil fertilization. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 12(1): 45-58.
- 25- Khayyat M., Tafazolli E., Eshghi S., and Rajaei S. 2007. Effect of nitrogen, boron, potassium and zinc sprays on yield and fruit quality of date palm. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 2(3): 289-296.
- 26- Lester G.E., Jifon J.L., and Rogers G. 2005. Supplemental foliar potassium applications during muskmelon fruit development can improve fruit quality, ascorbic acid, and beta-carotene contents. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130: 649-653.
- 27- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.
- 28- Lin D., Huang D., and Wang S. 2004. Effects of potassium levels on fruit quality of muskmelon in soilless medium culture. Scientia Horticulturae, 102(1): 53-60.
- 29- Magdoff, F.R. (1992). Building soils for better crops: organic matter management. University of Nebraska Press, Lincoln, NE, 176 pp.
- 30- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. (2nd ed). Academic Press, New York.
- 31- Marzouk H.A. 2011. Soil Fertilization Study on Zaghloul Date Palm Grown in Calcareous Soil and Irrigated with Drainage Water. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 10(5): 728-736.
- 32- Marzouk H.A., and Kassem H.A. 2011. Improving fruit quality, nutritional value and yield of Zaghloul dates by the application of organic and/or mineral fertilizers. Scientia Horticulturae, 127(3): 249-254.
- 33- Mengel K., and Kirkby E.A. 2001. Principles of plant nutrition. (5th Ed). Kluwer Academic Publishers.
- 34- Mengel K. 1980. Effect of potassium on the assimilate conduction to storage tissue. Ber. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 93: 353-362.
- 35- Mengel K. 1995. Iron availability in plant tissues – iron chlorosis on calcareous soils. p. 389-397. In J. Abadia (Ed.), Iron nutrition in soils and plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- 36- Mohammadi Z., Roosta H.R., Tajabadipour A., and Hokmabadi H. 2013. Effect of Nitrogen, Manure, Potassium and Iron on Yield, Fruit Quality and Leaf Mineral Nutrient Content in *Pistacia vera* cv. Fandoghi Grafted on Badami-Riz Zarand Rootstock. Journal of Horticultural Sciences, 27(2): 117-129.
- 37- Mollavali M., Bolandnazar S., and Tabatabaei S.J. 2009. Effect of Ammonium Nitrate and Potassium Sulfate on Concentration of Some Nutrients in Onion. Journal of Horticultural Sciences, 25(1): 101-108.
- 38- Obiefuna J.C., Majumder P.K., and Ucheagwu A.C. 1987. Fertilizer rates for increased pineapple production in the tropical ferrallitic soils of south western Nigeria. Fertilizer Research, 12: 99-105.
- 39- Pettigrew W.T. 1999. Potassium deficiency increases specific leaf weights and leaf glucose levels in field grown cotton. Agronomy Journal, 91: 962-968.
- 40- Prsa I., Stampar F., Vodnik D., and Veberic R. 2007. Influence of nitrogen on leaf chlorophyll content and photosynthesis of 'Golden Delicious' apple. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science, 57(3): 283 - 289.
- 41- Reddy K.J. 2006. Nutrient stress. p. 187-217. In: K.V. Madhava et al., (eds) physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. Springer. Printed in the Netherlands.
- 42- Roosta H.R. and Schjoerring J.K. 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber plants. Journal of Plant Nutrition, 30(11): 1933-1951.
- 43- Roosta H.R. 2006. Physiological aspects of ammonium and nitrate nutrition in cucumber and tomato plants: studies of ammonium toxicity and alleviation methods. Ph.D. Thesis. Copenhagen, Denmark.
- 44- Roosta H.R., Sajjadinia A., Rahimi A., and Schjoerring J.K. 2009. Responses of cucumber plant to NH₄⁺ and NO₃⁻ nutrition: the relative addition rate technique vs. cultivation at constant nitrogen concentration. Scientia

- Horticulturae, 3251: 1-7.
- 45- Rowe E.C., Smart S.M., Kenned V.H., Emmett B.A., and Evans C.D. 2008. Nitrogen deposition increases the acquisition of phosphorus and potassium by heather *Calluna vulgaris*. *Environmental Pollution*, 155(2): 201-207.
 - 46- Rufty T.W., Jackson W.A., and Raper C.D. 1982. Inhibition of nitrate assimilation in roots in the presence of ammonium: the moderating influence of potassium. *Journal of Experimental Botany*, 33(6): 1122-1137.
 - 47- Saleh J. 2009. Yield and chemical composition of 'Piarom' Date-Palm *Phoenix dactylifera* as affected by nitrogen and phosphorus Levels. *International Journal of Plant Production*, 3(3): 57-64.
 - 48- Serna M.D., Borrás R., Legaz F., and Primo-millo E. 1992. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant and Soil*, 147(1): 13-23.
 - 49- Sideris C.P., and Young H.Y. 1947. Effects of nitrogen on chlorophyll, acidity, ascorbic acid, and carbohydrate fractions of (*Ananas comosus* L.) merr. *Plant Physiology*, 22(2): 97-116.
 - 50- Singh B.K., and Modgal S.C. 1978. Dry-matter production, phosphorus and potassium uptake as influenced by levels and methods of nitrogen application in rainfed upland rice. *Plant and Soil*, 50(1): 691-701.
 - 51- Singh P., Agrawal M., and Agrawal S.B. 2011. Differences in Ozone Sensitivity at Different NPK Levels of Three Tropical Varieties of Mustard (*Brassica campestris* L.): Photosynthetic Pigments, Metabolites, and Antioxidants. *Water Air Soil Pollution*. 214: 435-450.
 - 52- Swamy U., Wang M., Tripathy J.N., Kim S.K., Hirasawa M., Knaff D. B., and Allen J.P. 2005. Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur: siroheme cofactor. *Biochemistry*, 44: 16054-16063.
 - 53- Telfer A., Pascal A., and Gall A. 2008. Carotenoids in Photosynthesis. p. 265-308. In: G. Britton et al., (eds). *Carotenoids: natural functions*, vol. 4. Basel, Switzerland; Boston.
 - 54- Thorne G. N. 1955. Interactions of nitrogen, phosphorus, and potassium supplied in leaf sprays or in fertilizer added to the soil. *Journal of Experimental Botany*, 6: 20-42.
 - 55- Trudel M.J., and Ozbun J.L. 1971. Influence of potassium on carotenoid content of tomato fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 96(6): 763-765.
 - 56- Van Beusichem M.L., Kirkby E.A., and Bass R. 1988. Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiology*, 86(3): 914-921.
 - 57- Venkatesan S., Murugesan S., Senthur Pandian V.K., and Ganapathy M.N.K. 2005. Impact of sources and doses of potassium on biochemical and greenleaf parameters of tea. *Food Chemistry*, 90(4): 535-539.
 - 58- Wallace A. 1991. Rational approaches to control iron deficiency other than plant breeding and choice of resistant cultivars. *Plant and Soil*, 130(1): 281-288.
 - 59- Wallace A., Wallace G.A., and Cha J.W. 1992. Some modifications in trace metal toxicities and deficiencies in plants resulting from interactions with other elements and chelating agents. – The special case of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10): 1589-1598.
 - 60- Wang X.T., and Below F.E. 1998. Accumulation and partitioning of mineral nutrients in wheat as influenced by nitrogen form. *Journal of Plant Nutrition*, 21(1): 49-61.
 - 61- Wolken J.J., and Mellon A.D. 1956. The relationship between chlorophyll and the carotenoids in the algal flagellate, euglena. *The Journal of General Physiology*, 39(5): 675-685.
 - 62- Zeng Q.P., and Brown P.H. 2001. Potassium fertilization affects soil K, leaf K concentration, and nut yield and quality of mature pistachio trees. *HortScience*, 36(1): 85-89.
 - 63- Zorba C., Senbayram, M., and Peiter, E. 2014. Potassium in agriculture – Status and perspectives. *Journal of Plant Physiology*, 171: 656-669.



Effects of Cow Manure, Ammonium Sulfate and Potassium Sulfate on Physico-Chemical Indices of Fruit and Leaf of Mazafati Date (*Phoenix Dactylifera* L.)

E. Aryakia^{1*} - H.R. Roosta² - N. Rahmizade³

Received: 09-07-2014

Accepted: 05-07-2017

Introduction: Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is one of the most important fruit species grown in Iran. This plant is mainly grown in the south of the country, where pH of soil is high, resulting in poor nutrient uptake. Furthermore, because of high yield and annual pruning of date palm, large amounts of macro and micronutrients are removed from soil. So, annual fertilizing should be applied for good performance. Research shows that use of manure alone or in combination with mineral fertilizers improves physico-chemical indices of fruits and leaves of palm trees. Regarding to high nutrition dependency of date palm, it is necessary to evaluate the effect of different fertilizers on physico-chemical indices of its leaf and fruit. The main objectives of this study were thus to evaluate the effect of cow manure, ammonium sulfate and potassium sulfate on physico-chemical indices in fruit and leaf of Mazafati date.

Materials and Methods: This study was conducted in bam zone, Kerman, Iran, in 2011- 2012. The area was located at 28°53'40"N latitude, 58°37'18"E longitude and 1050 m above sea level. A factorial experiment in a randomized complete block design was performed during month of March. Factors included ammonium sulfate (0, 500 and 1000 g/tree), potassium sulfate (0, 750 and 1500 g/tree) accompanied by cow manure (5 kg/tree). For leaf and fruit analysis, sampling was performed during month of June. Physico-chemical indices including nitrogen, potassium, iron, chlorophyll a, b and total, carotenoid, fruit weight, fruit diameter, fruit length, TSS and TSS/TA were evaluated. Chlorophyll was measured by using the method of Lichtenthaler (1987). Total soluble solid (TSS) was measured by using refractometer. Statistical analysis was performed using SPSS software and the treatment means were separated by Duncan's multiple range tests.

Results and Discussion: Results showed that because of supplying nitrogen, sulfur and potassium and their significant effects on noted physico-chemical indices, the highest nitrogen and iron content, photosynthetic pigments of carotenoid and chlorophyll (a and total) of leaf, and fruit weight were obtained in treatments of ammonium sulfate (1000 g/tree) and potassium sulfate (1500 g/tree) combination with cow manure (5 kg/tree). The highest potassium content of leaf, TSS and TSS/TA ratio of fruit were obtained by using ammonium sulfate (500 g/tree) and potassium sulfate (1500 g/tree) in combination with cow manure. The general increase in physico-chemical indices of fruits and leaves of date palm by the application of cow manure plus mineral fertilizer might be due to the increase in the availability of nutrients especially available N, P and K in the soil. In many reports, the effects of mineral fertilizers on nitrogen, potassium and iron content of the plant tissues were discussed. For example, date palm (two cultivars including Zaghloul and Samany) treated by ammonium nitrate and nitrobean (a bio-fertilizer) had the highest amount of leaf nitrogen and potassium. The highest rates of nitrogen, iron and potassium in palm fruit were obtained from cow manure in combination with NPK. Nitrogen, iron and potassium contents of the date and pistachio were increased by using ammonium sulfate fertilizer. Fruit weight, length, diameter and dry weight increased, while fruit moisture content decreased by organic manures either alone or in combination with mineral NPK as compared to the mineral N. Higher fruit TSS was obtained by the application of organic manures alone or in combination with mineral NPK as compared with mineral fertilization alone. Nitrogen concentration can be increased by using nitrogen fertilizer, for example ammonium increased leaf nitrogen concentration more than nitrate. Mineral nutrient, especially sulfur and nitrogen supplied by ammonium sulphate and potassium sulphate, increased the content of chlorophyll and carotenoid due to their roles in the synthesis of these compounds. Higher potassium content of leaves promotes photosynthetic rate of chloroplast, phloem transport of photosynthates to sink tissues and finally improves quality and yield of the fruit, which is associated with high sugar content.

Conclusions: For feeding of date palm tree, cow manure fertilization alone is insufficient. Ammonium sulfate and potassium sulfate alone or in combination with cow manure could improve physico-chemical indices

1- Plant bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC) (ACECR), Karaj, I.R. Iran

(*-Corresponding Author Email: aryakia@ibrc.ir)

2- Professor of Horticultural Science, Plant Nutrition, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3- Faculty of Agriculture, Azad university of Jiroft, Iran

of leaves and fruits. This mixed fertilizer, supplying nitrogen, potassium and sulfur macronutrients, had significant effect on physico-chemical parameters, and subsequently improved the content of nitrogen, iron, potassium, photosynthetic pigments (*a*, *b* and total, carotenoid), TSS, TSS/TA ratio and the fruit weight.

Keywords: Photosynthetic pigments, Nutrition, Minerals and TSS



اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی لاله واژگون *Fritillaria imperialis* L.

اسماعیل چمنی^{1*} - مرضیه قمری² - مهدی محب‌الدینی³ - علیرضا قنبری⁴ - حمیدرضا حیدری⁵

تاریخ دریافت: 1393/09/05

تاریخ پذیرش: 1396/04/09

چکیده

لاله واژگون از زیباترین گل‌های زینتی و داروئی بومی ایران است، که در معرض خطر انقراض می‌باشد. در این پژوهش کالوس‌های لاله واژگون به عنوان ریز نمونه در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف NAA (0، 0/3 و 0/6 میلی گرم بر لیتر) در ترکیب با سه سایتوکینین BA (0، 0/3 و 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر)، TDZ (0، 0/1 و 0/3 و 0/5 میلی گرم بر لیتر) و Kin (0، 0/5 و 1 و 1/5 میلی گرم بر لیتر) در قالب سه آزمایش جداگانه بر پایه طرح کاملاً تصادفی کشت گردیدند. نتایج به دست آمده نشان داد که در هر سه آزمایش، در محیط کشت‌های حاوی 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA در ترکیب با همه غلظت‌های سایتوکینین‌ها بیشترین میزان کالوس‌زایی (100 درصد) به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد هر چند کالوس‌زایی در محیط‌های فاقد NAA نیز انجام گرفت، اما به منظور دستیابی به حداکثر کالوس‌زایی حضور NAA ضروری می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در محیط‌های فاقد سایتوکینین در هر سه آزمایش، باززایی صورت نپذیرفت. همچنین حضور NAA در ترکیب با Kin برای باززایی ضروری می‌باشد و در محیط‌هایی که تنها حاوی Kin می‌باشد، هیچ گونه باززایی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، تیدیاورون، سایتوکینین، شرایط درون شیشه ای، گیاه زینتی

مقدمه

تنوع ژنتیکی ارزشمند این گیاه، به دست آوردن یک روش کار تکثیر سریع و کارآمد می‌باشد. تحقیقات پیشین نشان می‌دهند که روش‌های تکثیر سنتی مانند فلس‌برداری و تقسیم پیاز در لاله واژگون نمی‌توانند روش‌هایی کارا و مناسب برای ازدیاد این گیاه باشند (19). همچنین در روش ازدیاد جنسی و از طریق بذر تولید دانه‌های ضعیف حاصل از بذر، کندی رشد و نمو بذر و بروز درصد بالایی از هتروزیگوسیتی استفاده از این روش ازدیاد را محدود کرده است (9). با توجه به مطالب فوق و یافته‌های بسیاری از پژوهشگران، می‌توان چنین برداشت کرد که امروزه روش‌های کلاسیک تکثیر لاله واژگون جوابگوی درخواست روز افزون این گیاه و همچنین مقابله و حفظ این گیاه از خطر انقراض نبوده و باید با روش‌های جدید جایگزین گردند. یکی از راه‌های رسیدن به این اهداف، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی از قبیل کشت بافت می‌باشد. تکنیک‌های کشت بافت کمک می‌کند گیاهانی که از نظر اقتصادی مهم هستند با کشت مرستهم، کالوس و غیره در مقیاس بالا و به صورت عاری از عوامل بیماری‌زا تکثیر شوند. در کشت بافت لاله واژگون از ریزنمونه‌های مختلف می‌توان به منظور تکثیر استفاده کرد. پیاز و فلس معمول‌ترین ریزنمونه در کشت بافت گیاهان پیازی است (22). حمیداوغلی و

لاله واژگون⁶ متعلق به خانواده لیلیاسه⁷، از گل‌های باارزش و بومی ایران می‌باشد. این گیاه از گیاهان علفی پیازدار و چند ساله است، که دارای اهمیت زینتی و داروئی است. مناطق حفاظت‌شده‌ی مانشت ایلام، گلستان کوه در خوانسار، ارتفاعات اشترانکوه لرستان و کوه‌های صمصامی در چهار محال و بختیاری، از مهمترین مناطق پراکنش لاله واژگون در ایران هستند (1). لاله واژگون چهارمین اثر طبیعی ملی ایران است که متأسفانه در سال‌های اخیر به دلیل برداشت بی‌رویه‌ی گل و پیاز و تخریب مراتع در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. مهمترین مسئله در نجات این گیاه از انقراض و حفظ

1، 2، 3 و 4 - به ترتیب استاد، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران و دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

(* - نویسنده مسئول)

(Email: echamani@uma.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.38023

6- *Fritillaria imperialis* L.

7- Liliaceae

همکاران (2) باززایی مستقیم سوخچه از کشت فلس‌های گندزدایی شده‌ی لاله واژگون در محیط MS در حضور تنظیم کننده‌های رشد ایندول استیک اسید¹، 2-4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید²، کینتین³، بنزیل آدنین⁴ و نفتالین استیک اسید⁵ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بالاترین میزان باززایی مستقیم (33/8 عدد سوخچه)، بیشترین اندازه سوخچه (26 میلی‌متر) و بیشترین تعداد ریشه (8 عدد) در تیمار 2 میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد و در محیط کشت های حاوی بنزیل آدنین هیچ سوخچه‌ای تشکیل نشد. همچنین محمدی ده چشمه و همکاران (19) از ریزنمونه‌های جنین، گلبرگ و گل آذین به منظور تکثیر لاله واژگون از طریق کشت بافت از دو مسیر اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم استفاده کرد. تلاش برای به‌دست آوردن روشی مناسب و اقتصادی به منظور ریزازدیادی لاله واژگون نقش مهمی در حفظ این گیاه از خطر انقراض دارد. لذا این تحقیق با هدف بهینه سازی شرایط کشت لاله واژگون به منظور تکثیر و باززایی و بررسی اثر سطوح مختلف برخی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزنمونه کالوس انجام شد. در این پژوهش قابلیت باززایی ریزنمونه کالوس به‌دست آمده از پیاز لاله واژگون در محیط ام اس حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی NAA، BA، TDZ و Kin مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل کالوس در گیاهان تک لپه‌ای در مقایسه با گیاهان دولپه‌ای کمتر صورت می‌گیرد (4). محققین بسیاری وجود نسبت مناسبی از اکسین و سیتوکینین را برای القای کالوس ضروری دانستند. بررسی اثر تنظیم کننده‌ی رشد سیتوکینین در روند باززایی با توجه به نوع سیتوکینین بکار برده شده و غلظت‌های مختلف در گیاهان متفاوت است (8 و 11).

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی علوم باغبانی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. سوخ‌های لاله واژگون در آبان ماه سال 1391 از منطقه‌ی مانشت ایلام جمع آوری گردیدند و سپس به منظور گذراندن نیاز سرمایی به مدت یک ماه در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در ورمی کولیت مرطوب نگهداری شدند. به منظور آماده‌سازی و ضدعفونی سوخ‌ها برای کشت، ابتدا سوخ‌های لاله واژگون به خوبی با آب، اسفنج و یک قطره مایع ظرفشویی به منظور حذف گل و لای شسته شدند و سپس به مدت 1 ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها ابتدا به

مدت 1 دقیقه در الکل 70 درصد غوطه‌ور شدند. بعد از گذشت این زمان پیازها به زیر هود لامینار منتقل شده و با آب دیونیزه استریل آبکشی شدند. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به مدت 20 دقیقه در هیپوکلریت سدیم 5 درصد به همراه یک قطره توئین 20⁶ ضدعفونی شدند و در مرحله‌ی آخر سه مرتبه به مدت 45 دقیقه با آب دیونیزه استریل و به منظور حذف اثر سمیت مواد ضدعفونی کننده، آبکشی شدند. هر پیازچه بسته به اندازه، به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد و در محیط کشت MS حاوی 0/8 درصد آگار و غلظت‌های مختلف NAA و 2,4-D کشت شدند. بعد از کشت، نمونه‌ها در دمای 25±2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری 16 ساعت روشنایی (1500 لوکس از منبع نور فلورسنت) و 8 ساعت تاریکی، در اتاقک رشد قرار گرفتند. دو ماه پس از کشت، درصد کالوس‌های تشکیل شده و تعداد پیازچه اندازه‌گیری شد. به منظور تکثیر و باززایی، پیازچه‌های تشکیل شده از ریزنمونه‌ی اولیه جدا شده و سپس به مدت یک ماه در محیط MS کشت داده شدند. سپس پیازچه‌ها به اندازه‌های نیم سانتی متری تقسیم شده و در قالب سه آزمایش جداگانه در محیط کشت MS حاوی سه غلظت NAA (0، 0/3 و 0/5 میلی گرم بر لیتر) در ترکیب با غلظت‌ها و انواع مختلف سیتوکینین کشت گردیدند. در آزمایش اول، محیط کشت حاوی NAA و چهار غلظت BA (0، 0/3 و 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر)، آزمایش دوم حاوی NAA و چهار غلظت TDZ (0، 0/3 و 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر) و آزمایش سوم حاوی NAA و چهار غلظت Kin (0، 0/5 و 1 و 1/5 میلی گرم بر لیتر) استفاده گردید. سپس کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای 25±2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری 16 ساعت روشنایی (1500 لوکس از منبع نور فلورسنت) و 8 ساعت تاریکی قرار داده شدند. به منظور تسریع در رشد ریز نمونه‌ها، کشت‌ها هر سه هفته یک بار واکشت شده و سه ماه پس از کشت، درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد و طول برگ و ریشه اندازه‌گیری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار شامل پنج ریز نمونه) انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. به دلیل نرمال نبودن داده‌های مربوط به درصد کالوس‌زایی، تعداد و طول برگ و ریشه از روش‌های ناپارامتری کروسال والیس⁷ و من ویتنی⁸ برای تجزیه استفاده گردید.

1- Indole-3-acetic acid (IAA)

2- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

3- Kinetin (Kin)

4- 6-benzyladenine (BA)

5- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

6- Tween 20

7- Kruskal-Wallis

8- Mann-Whitney

نتایج

آزمایش اول

تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، طول برگ، تعداد و طول ریشه لاله واژگون

با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول 2)، در چندین ترکیب تیماری آزمایش اول، میزان 100 درصد کالوس‌زایی مشاهده شده است. بهترین نتایج به منظور القای کالوس در تیمارهای صفر و یک میلی گرم بر لیتر NAA در ترکیب با یک میلی گرم BA و در هر سه غلظت BA در ترکیب با 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA به دست آمده است. از طرفی ترکیب تیماری 0/5 میلی گرم بر لیتر BA و بدون کاربرد NAA کم‌ترین تأثیر را بر کالوس‌زایی را به میزان 25 درصد داشت. این نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی زمانی که غلظت NAA پایین و یا صفر بود، تنها در بالاترین غلظت BA به حداکثر میزان خود (100 درصد) رسید، این در حالی است که در غلظت‌های بالای NAA (0/6 میلی گرم در لیتر) در هر سه غلظت BA تولید کالوس با میزان 100 درصد بدست آمد. به عنوان نتیجه‌ی کلی می‌توان گفت هر چند کالوس‌زایی در محیط‌های فاقد NAA نیز انجام گرفت، اما به منظور دستیابی به حداکثر کالوس‌زایی حضور NAA لازم بود و با افزایش غلظت آن، تولید کالوس نیز افزایش می‌یابد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از درصد کالوس‌زایی تیمار شاهد می‌توان چنین برداشت کرد که کالوس‌زایی بدون وجود اکسین و یا سایتوکینین‌ها در لاله واژگون با حداکثر میزان (100 درصد) اتفاق افتاده است. در آزمایشی چادهاری و کیو (7) گزارش کردند که در علف پنجه مرغی¹ استفاده از غلظت‌های پایین سایتوکینین (0/04 میکرومولار بنزیل آدنین) در محیط القای کالوس حاوی اکسین، تشکیل کالوس‌های جنین‌زا را افزایش داد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که در محیط‌های فاقد NAA، با افزایش غلظت BA از 0/3 به 1 میلی گرم در لیتر، باززایی از 25 درصد به 75 درصد افزایش یافت. نتایج مشابه در تحقیق بنیان‌پور و خوشخوی (7) در تأثیر NAA و BA بر تولید شاخساره گزارش شد که باززایی در حضور BA و بدون NAA انجام شد و با افزایش غلظت BA، طول دوره‌ی باززایی کاهش یافت. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان دهنده‌ی عدم ضرورت حضور NAA به منظور باززایی است، در حالی که حضور BA به منظور باززایی نیاز است. هر چند نتایج نشان داد که به منظور تولید کالوس حضور نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین و به منظور باززایی BA ضروری است، ولی مقایسه این نتایج با

تیمار شاهد نشان داد که کالوس‌زایی و باززایی بدون حضور NAA یا BA نیز صورت گرفت و درصد آن مطابق با بهترین درصد تولید کالوس (100 درصد) و باززایی (75 درصد) ترکیب‌های تیماری NAA و BA بود. بررسی این نتایج نشان می‌دهد که درصد کالوس‌زایی و باززایی کالوس‌های لاله واژگون در تیمار شاهد قابل قبول است. همچنین نتایج همبستگی داده‌ها، همبستگی درصد باززایی را با صفات درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، میانگین طول برگ و ریشه در سطح احتمال 1 درصد و با دو صفت تعداد برگ و ریشه در سطح احتمال 5 درصد را نشان دادند (جدول 3). علاوه بر تأثیر NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی، تأثیر این هورمون‌ها همچنین بر تعداد برگ، طول برگ، تعداد و طول ریشه و تعداد پیازچه نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج جدول مقایسه میانگین مربوط به تعداد برگ نشان دادند که بیشترین تعداد برگ در تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر BA با تعداد 17 برگ مشاهده شد. بالاترین میانگین طول برگ در تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر BA با میانگین طول 4 سانتی‌متر مشاهده شد (جدول 2). در تعیین همبستگی تعداد برگ با صفات دیگر، همبستگی تعداد برگ و قطر کالوس، طول برگ و تعداد ریشه در سطح احتمال 1 درصد و با درصد باززایی در سطح احتمال 5 درصد همبستگی را نشان داد. طول برگ نیز با قطر کالوس، تعداد برگ و ریشه همبستگی در سطح احتمال 1 درصد و با طول ریشه در سطح احتمال 5 درصد همبستگی نشان داد (جدول 3). بیشترین تعداد ریشه با تعداد 12 عدد در تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر BA مشاهده شد. بلندترین طول ریشه مربوط به ترکیب تیماری صفر میلی گرم در لیتر NAA و 1 میلی گرم در لیتر BA مشاهده شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 2). با مقایسه نتایج مربوط به میزان باززایی، تعداد برگ و تعداد ریشه می‌توان چنین برداشت کرد که تنها در ترکیب تیماری 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر BA بیشترین تعداد برگ (17 برگ) و در نتیجه بالاترین میانگین طول برگ (4 سانتی‌متر) و بالاترین تعداد ریشه مشاهده شد، که می‌توان این نتیجه را به نقش مثبت برگ‌ها در القای ریشه‌زایی مربوط دانست. برگ‌ها دارای مقادیر بالایی از اکسین‌ها هستند که این هورمون نقش اساسی در تحریک ریشه‌زایی دارد. در بررسی همبستگی تعداد و میانگین طول ریشه نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد ریشه در دو صفت تعداد و میانگین طول برگ در سطح احتمال 1 درصد و با دو صفت درصد باززایی و میانگین طول ریشه در سطح احتمال 5 درصد همبستگی داشت و میانگین طول ریشه همبستگی در سطح احتمال 1 درصد را تنها با درصد باززایی نشان داد و با درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، میانگین طول برگ و تعداد ریشه در سطح احتمال 5 درصد همبستگی داشت (جدول 3). در بحث همبستگی به دست آمده بین تعداد ریشه

آزمایش دوم

تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و TDZ بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد و میانگین طول برگ، تعداد ریشه و میانگین طول ریشه در لاله واژگون نتایج آزمون تجزیه واریانس داده‌ها (جدول 4) نشان داد که درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در بررسی اثر NAA و TDZ بر کالوس‌زایی، تولید کالوس در تمام تیمارها مشاهده شد.

با درصد باززایی، تعداد برگ و میانگین طول برگ می‌توان به نقش برگ‌ها به عنوان منبعی غنی از اکسین‌ها به منظور تحریک ریشه‌زایی اشاره نمود. در نتیجه با افزایش باززایی و به دنبال آن افزایش تعداد و میانگین طول برگ میزان اکسین تولید شده بالا رفته و ریشه‌زایی نیز افزایش می‌یابد.

جدول 1- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی لاله واژگون
Table 1- Analysis of Variance for Effect of Different Concentration of NAA and BA Combinations on Callogenesis Percentage, Calli Diameter and Regeneration Percentage in *Fritillaria imperialis* L.

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squares	
		درصد باززایی Percent of Regeneration	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter
NAA	2	6.29**	0.350*
BA	3	9.67**	0.332*
BA × NAA	6	16.89**	0.321*
اشتباه آزمایش Error	36	0.018	0.135
ضریب تغییرات (%) CV (%)	-	9.56	26.43

** و ***: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1٪

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

جدول 2- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه لاله واژگون

Table 2- Mean comparison of the effects of different concentrations of BA and NAA combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, Average length of leaf and Average length of root in *Fritillaria imperialis* L.

غلظت NAA (mg/l) NAA Concentration	غلظت BA (mg/l) BA Concentration	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس (Cm) Average of Callus Diameter	درصد باززایی Percent of Regeneration	تعداد برگ Number of Leaves	میانگین طول برگ (Cm) Average length of Leaves	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه (Cm) Average Length of Roots
0	0	100 ^a	1.75 ^{ab}	75 ^a	5 ^c	2 ^b	2 ^c	0.8 ^{ab}
	0.3	50 ^b	1 ^{ab}	25 ^c	1 ^t	1 ^c	0 ^d	0 ^b
	0.5	25 ^c	0.75 ^b	25 ^c	1 ^t	0.5 ^d	0 ^d	0 ^b
	1	100 ^a	2.5 ^a	75 ^a	4 ^{cd}	3 ^{ab}	5 ^b	2 ^a
0.3	0	50 ^b	0.5 ^b	0 ^d	0 ^g	0 ^e	0 ^d	0 ^b
	0.3	75 ^a	1.07 ^{ab}	0 ^d	0 ^g	0 ^e	0 ^d	0 ^b
	0.5	75 ^a	2 ^{ab}	75 ^a	17 ^a	4 ^a	12 ^a	0.4 ^b
	1	100 ^a	1.75 ^{ab}	50 ^b	2 ^e	0.7 ^d	2 ^e	0.2 ^b
0.6	0	75 ^a	1 ^{ab}	0 ^d	0 ^g	0 ^e	0 ^d	0 ^b
	0.3	100 ^a	2.5 ^a	75 ^a	8 ^b	1.7 ^b	0 ^d	0 ^b
	0.5	100 ^a	2.25 ^a	0 ^d	0 ^g	0 ^e	0 ^d	0 ^b
	1	100 ^a	2.37 ^a	75 ^a	8 ^b	1.6 ^b	0 ^d	0 ^b

میانگین‌های با حروف یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری (در سطح احتمال 5٪) با یکدیگر ندارند.

Numbers followed by the same letter in each Column are not significantly different

جدول 3- همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه در آزمایش مربوط به غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA در لاله واژگون

Table 3- Correlation between callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root in study of different concentrations of BA and NAA combinations

منابع تغییرات Source of Variations	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration Percent	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه Average Length of Roots
درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	1						
میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	0.529**	1					
درصد باززایی Regeneration Percent	0.431**	0.398**	1				
تعداد برگ Number of Leafs	0.061	0.443**	0.300*	1			
میانگین طول برگ Average length of Leafs	0.170	0.531**	0.468**	0.687**	1		
تعداد ریشه Number of Roots	0.076	0.066	0.330*	0.404**	0.464**	1	
میانگین طول ریشه Average Length of Roots	0.318*	0.285	0.423**	0.068	0.322*	0.329*	1

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5% و 1%

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

بهترین ترکیب‌های تیماری به‌دست آمده به منظور تولید کالوس هستند. نتایج حاصل از بررسی همبستگی درصد کالوس‌زایی با سایر صفات نشان داد که این صفت تنها با قطر کالوس در سطح احتمال 1 درصد همبستگی داشت (جدول 6). طبق نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل غلظت NAA و TDZ بر قطر کالوس در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار شد (جدول 4). بیشترین میانگین قطر کالوس در ترکیب تیماری 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و صفر میلی گرم در لیتر TDZ مشاهده شد. تیمارهای صفر میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ و 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ با میانگین 0/25 سانتی متر کوچک‌ترین قطر کالوس را داشتند (جدول 5). بررسی همبستگی میان قطر کالوس با صفات دیگر نشان داد که بین قطر کالوس با درصد کالوس‌زایی، تعداد و میانگین طول برگ همبستگی معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد وجود داشت (جدول 5). TDZ علاوه بر تحریک القای کالوس، بر باززایی کالوس‌های لاله واژگون نیز تأثیر گذار بود. تجزیه و تحلیل داده‌های باززایی نشان داد که اثر متقابل NAA و TDZ در سطح

با توجه به نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین می‌توان گفت علاوه بر شاهد، بهترین تیمار برای کالوس‌زایی محیط کشت - های حاوی غلظت‌های 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ و 0/6 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 0/1، 0/3 و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ است. از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های 0/6 میلی گرم در لیتر NAA در تمامی غلظت‌های TDZ بالاترین درصد کالوس‌زایی را با میزان 100 درصد نشان دادند. همین میزان کالوس‌زایی در تیمارهای شاهد و 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ نیز به دست آمد (جدول 5). از نتایج به دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که با افزایش غلظت NAA میزان تولید کالوس نیز افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که TDZ به تنهایی نیز قادر به تولید کالوس می‌باشد اما در ترکیب با نفتالین استیک اسید، درصد کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. کالوس‌زایی 100 درصد در تیمار شاهد نشان می‌دهد کالوس - های لاله واژگون بدون حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نیز قادر به تولید کالوس، برابر با بالاترین درصد تولید کالوس (100 درصد) در

لیتر TDZ مشاهده شد که با تیمار شاهد با میانگین طول برگ 2 سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 5). در بررسی همبستگی تعداد و میانگین طول برگ با سایر صفات، همبستگی معنی‌دار مثبت بین تعداد برگ با قطر کالوس درصد باززایی و میانگین طول برگ در سطح احتمال 1 درصد مشاهده شد. همچنین میانگین طول برگ نیز با قطر کالوس، درصد باززایی و تعداد برگ همبستگی مثبت در سطح احتمال 1 درصد نشان داد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در میان غلظت‌های مختلف NAA و TDZ، ترکیب تیماری 0/3 میلی- گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ با تعداد 8 ریشه دارای بالاترین تعداد ریشه بود و در بسیاری از تیمارها ریشه‌زایی مشاهده نشد. بالاترین میانگین طول ریشه در تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ مشاهده شد اما با تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/3 میلی گرم در لیتر TDZ با میانگین طول ریشه 1/6 سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج همبستگی تعداد و میانگین طول ریشه نیز نشان داد که تعداد ریشه و طول ریشه در سطح احتمال 1 درصد با یکدیگر همبستگی مثبت داشتند. در این آزمایش همبستگی مستقیمی بین درصد باززایی و یا تعداد برگ با تعداد و میانگین طول ریشه و نتایج به‌دست آمده در آزمایش NAA و BA مشاهده نشد (جدول 6).

بررسی نتایج مربوط به باززایی و کالوس‌زایی در هر سه ترکیب تیماری NAA و BA، NAA و Kin و NAA و TDZ نشان داد که ترکیب NAA و BA بهترین ترکیب تیماری برای القای باززایی و تولید کالوس در مقایسه با دو ترکیب دیگر بود. خرمی‌راد و همکاران (17) نشان دادند که ترکیب NAA و BA، تأثیر بهتری بر تولید شاخساره‌های آنتوریوم⁴ در مقایسه با ترکیب NAA و Kin داشت. همچنین مقایسه‌ی درصد کالوس‌زایی و باززایی بین دو تیمار NAA در ترکیب با TDZ و یا Kin نشان داد که محیط‌های حاوی ترکیبات NAA و TDZ درصد بالاتری از تولید کالوس و باززایی را نسبت به NAA و Kin نشان دادند. در آزمایشی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی TDZ، بنزیل‌آمینوپورین و Kin بر تولید کالوس و باززایی گیاه سروپژیا⁵ مورد بررسی قرار گرفت و نتایجی مشابه با این تحقیق به دست آمد، مشاهده شد. نتایج نشان داد که TDZ در القای کالوس مؤثر است. نتایج حاصل از تأثیر Kin روی باززایی این گیاه نشان داد که Kin توانایی اندکی در القای باززایی در مقایسه با TDZ و بنزیل‌آمینوپورین⁶، حتی در سطوح بالا داشت (18). در اکثر گیاهان برای کالوس‌زایی نسبت مناسبی از اکسین و سایتوکینین‌ها ضروری است. این هورمون مسئول تنظیم سنتز پروتئینی که طی تشکیل دوک

احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 4). بهترین تیمار برای باززایی را تیمارهای شاهد و همچنین ترکیب تیماری 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و TDZ با درصد باززایی 75 درصد بودند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که در ترکیب‌های تیماری صفر میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ، 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و صفر میلی گرم در لیتر TDZ، 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و صفر میلی گرم در لیتر TDZ و 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و 1 میلی گرم در لیتر TDZ هیچ گیاه باززایی شده‌ای مشاهده نشد (جدول 5). در گزارش‌های ارائه شده توسط محققین، نقش برجسته و مهم TDZ در باززایی شاخساره‌های نابجا تأیید شده است (13). در این پژوهش نیز در عدم حضور TDZ هیچ گونه باززایی مشاهده نشد. نتایج نشان داد بیشترین میزان باززایی در تیمار شاهد و همچنین 0/3 میلی گرم در لیتر NAA در ترکیب با 0/1 میلی گرم در لیتر TDZ با میزان 75 درصد مشاهده شد. از مقایسه این نتایج با نتایج به دست آمده از باززایی سایر تیمارها می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت‌های پایین (0/3 میلی گرم در لیتر) TDZ در ترکیب با غلظت‌های پایین (0/1 میلی گرم در لیتر) TDZ مؤثرتر از غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر این دو تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی بوده است. این نتایج را می‌توان به اثر بازدارندگی غلظت‌های بالای NAA از باززایی مربوط دانست (16). در آزمایشی باباوقلو و همکاران (3) نیز در تأثیر NAA و TDZ روی باززایی گیاه توت روباه¹ گزارش کردند که 5 میکرومولار TDZ در ترکیب با 1 میکرومولار NAA تأثیر بسیار خوبی بر باززایی و تولید شاخساره داشت، در حالی که ترکیب TDZ با غلظت‌های بالاتر از 1 میکرومولار NAA، منجر به عدم تولید شاخساره شد. هائو و همکاران (13) گزارش کردند که TDZ به تنهایی و یا در ترکیب با NAA می‌تواند باززایی شاخساره‌های نابجا را در گیاه عناب² تحریک کند. در آزمایشی دیگر هبرت و همکاران (14) روی گیاه آزالیا³ نشان دادند که اثر متقابل تأثیر غلظت‌های TDZ و NAA در باززایی کالوس و تشکیل شاخه معنی‌دار شد. تجزیه همبستگی داده‌ها رابطه‌ی معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد را بین درصد باززایی با تعداد و میانگین طول برگ نشان داد (جدول 6). تجزیه و تحلیل داده‌های تعداد برگ، میانگین طول برگ، تعداد ریشه و میانگین طول ریشه با استفاده از روش‌های ناپارامتری انجام شدند. بهترین تیمار به منظور تولید برگ تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر TDZ با تعداد 6 برگ به همراه تیمار شاهد با تعداد 5 برگ شناخته شدند. بالاترین میانگین طول برگ نیز با 3/2 سانتی‌متر در تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در

4- *Anthurium andreanum*
5- *Ceropegia pusilla*
6- Benzylaminopurine (BAP)

1- *Sanguisorba officinalis*
2- *Ziziphus jujuba*
3- *Rhododendron simsii*

در گوجه فرنگی، براسیلیرو و همکاران (6) در سیب‌زمینی، هرناندس و همکاران (15) در بلوط، نیز وجود نسبت مناسبی از اکسین و سایتوکینین را برای القای کالوس ضروری دانستند. بنابراین در مجموع به نظر می‌رسد که میزان تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در تولید کالوس و باززایی لاله واژگون نیاز به تحقیق و بررسی بیشتری دارد.

سلولی در تقسیم میتوز اتفاق می‌افتد، می‌باشد. به نظر می‌رسد کالوس‌هایی که بدون نیاز به افزودن سایتوکینین به رشد و تولید کالوس در محیط کشت ادامه می‌دهند، قادر به تولید طبیعی این هورمون هستند (21). این نتایج را می‌توان با نتایج دومینو و همکاران (10) مبنی بر مشاهدات اثر تنظیمی متقابل اکسین و سایتوکینین در سطح ژن در گیاه تنباکو توجیه کرد. همچنین گلشن و همکاران (12)

جدول 4- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب NAA و TDZ بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی
Table 4- Analysis of variance for different concentration of NAA and TDZ combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squares		
		درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration (%)
NAA	2	273.43**	0.69**	246.43**
TDZ	3	243.05**	0.44**	83.24**
TDZ × NAA	6	151.91**	0.32**	206.16**
اشتباه آزمایش Error	36	0.31	0.05	0.60
ضریب تغییرات (%) CV (%)	-	2.96	17.33	8.79

*** معنی‌دار در سطح احتمال 1%

**Significant in 1% level

جدول 5- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و TDZ بر درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه

Table 5- Mean comparison of the effects of different concentrations of NAA and TDZ combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root

غلظت NAA (mg/l) NAA Concentration	غلظت TDZ (mg/l) TDZ Concentration	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس (Cm) Average of Callus Diameter	درصد باززایی Percent of Regeneration	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ (Cm) Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه (Cm) Average Length of Roots
0	0	100 ^a	2 ^{ab}	75 ^a	5 ^a	2 ^a	2 ^{cd}	0.4 ^e
	0.1	75 ^b	1.75 ^{ab}	50 ^b	1 ^d	0.5 ^{ab}	0 ^f	0 ^g
	0.3	25 ^d	0.87 ^{cd}	0 ^d	0 ^e	0 ^b	0 ^f	0 ^g
	0.5	75 ^b	0.25 ^d	25 ^c	4 ^b	0.5 ^{ab}	2 ^{cd}	0.2 ^f
	0	50 ^c	1.5 ^{ab}	0 ^d	0 ^e	0 ^b	0 ^f	0 ^g
0.3	0.1	75 ^b	0.5 ^d	75 ^a	4 ^b	0.9 ^{ab}	1 ^e	0.5 ^d
	0.3	25 ^d	0.75 ^{cd}	50 ^b	3 ^{bc}	0.8 ^{ab}	8 ^a	1.6 ^{ab}
	0.5	100 ^a	0.25 ^d	50 ^b	6 ^a	3.2 ^a	1 ^e	2 ^a
	0	75 ^b	2.87 ^a	0 ^d	0 ^e	0 ^b	0 ^f	0 ^g
0.6	0.1	100 ^a	1 ^{bc}	25 ^c	1 ^d	0.5 ^{ab}	0 ^f	0 ^g
	0.3	100 ^a	187 ^{ab}	50 ^b	1 ^d	0.6 ^{ab}	0 ^f	0 ^g
	0.5	100 ^a	2 ^{ab}	0 ^d	0 ^e	0 ^b	4 ^b	1.2 ^{bc}

میانگین‌هایی با حروف یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری (در سطح احتمال 1٪) با یکدیگر ندارند.

Numbers followed by the same letter in each Column are not significantly differentns

جدول 6- همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه در غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و TDZ در لاله واژگون

Table 6-Correlation between callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root in study of different concentrations of BA and NAA combinations

منابع تغییرات Source of Variations	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration Percent	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه Average Length of Roots
درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	1						
میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	0.765**	1					
درصد باززایی Regeneration Percent	0.009**	0.064	1				
تعداد برگ Number of Leafs	0.141	0.416**	0.364*	1			
میانگین طول برگ Average length of Leafs	0.074	0.390**	0.416**	0.968**	1		
تعداد ریشه Number of Roots	- 0.173	- 0.110	0.223	0.191	0.178	1	
میانگین طول ریشه Average Length of Roots	- 0.189	0.126	0.223	0.191	0.178	0.590**	1

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5% و 1%

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

آزمایش سوم

تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی و تعداد برگ لاله واژگون

با توجه به نتایج تجزیه ناپارامتری کروسال والیس بین ترکیب‌های تیماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بهترین نتایج در تولید کالوس مربوط به تیمارهای شاهد و همچنین تیمارهای صفر میلی گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی گرم در لیتر Kin، 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی گرم در لیتر Kin، 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر Kin، 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و 1 میلی گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی گرم در لیتر Kin مشاهده شد و در مقابل تیمار صفر میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر Kin با 25 درصد تولید کالوس ضعیف‌ترین ترکیب تیماری در القای کالوس‌زایی شناخته شد (جدول 8). در بررسی میزان همبستگی نیز نتایج به دست آمده همبستگی مثبت و معنی‌داری بین درصد کالوس‌زایی با قطر کالوس و درصد

باززایی را در سطح احتمال 5 درصد و با تعداد ریشه در سطح احتمال 1 درصد نشان داد (جدول 9). بیشترین میانگین قطر کالوس نیز مربوط به تیمار 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و صفر میلی گرم در لیتر Kin با قطر 2/87 سانتی‌متر به دست آمد و کوچک‌ترین کالوس‌ها نیز در تیمار صفر میلی گرم در لیتر NAA در ترکیب با 0/3 میلی گرم در لیتر Kin و همچنین تیمار 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 0/3 میلی گرم در لیتر Kin مشاهده شد (جدول 8). نتایج تجزیه همبستگی میانگین قطر کالوس با سایر صفات نشان داد که قطر کالوس با درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال 1 درصد و با میانگین طول برگ در سطح احتمال 5 درصد همبستگی داشت (جدول 9). نتایج به دست آمده نشان داد کاربرد غلظت‌های مختلف NAA و Kin تأثیر معنی‌داری (سطح احتمال 1 درصد) بر درصد باززایی کالوس‌های لاله واژگون داشت (جدول 7). نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین درصد باززایی در تیمارهای شاهد، 0/3 میلی گرم در لیتر NAA و 1 میلی گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی گرم در لیتر Kin با میزان 75 درصد صورت گرفت.

میانگین طول برگ 2 سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 8). این نتیجه را می‌توان به تأثیر مثبت سایتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی و در نتیجه بلندتر شدن طول برگ مربوط دانست. تجزیه داده‌های همبستگی صفات تعداد برگ و طول برگ با سایر صفات نشان داد که همبستگی مثبت بین طول برگ با سه صفت درصد باززایی، میانگین طول برگ و نیز تعداد ریشه در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود. همبستگی مثبت معنی‌داری بین میانگین طول برگ با قطر کالوس در سطح احتمال 5 درصد و با درصد باززایی، تعداد برگ و ریشه در سطح احتمال 1 درصد وجود داشت (جدول 9). هر چند نتایج حاصل از بررسی تعداد ریشه در غلظت‌های مختلف ترکیب تیماری NAA و Kin نشان داد که ترکیب تیماری 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin با تعداد 7 ریشه بالاترین تعداد ریشه را در بین سایر تیمارها داشته است اما با تیمارهای 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin تفاوت معنی‌داری نداشته است. این نتایج تأکیدی بر نقش مثبت NAA در تحریک آغازیدن ریشه و در مقابل نقش بازدارنده Kin در این فرآیند است. از میان تیمارهایی که ریشه‌زایی در آن‌ها صورت گرفت تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin با میانگین طول ریشه 2/5 سانتی‌متر به عنوان بهترین ترکیب تیماری از نظر صفت طول ریشه شناخته شد که نشان دهنده‌ی نیاز کمتر گیاه به NAA در مرحله طویل شدن ریشه است (جدول 8). بررسی همبستگی بین تعداد ریشه با سایر صفات، نتایج حاصل وجود همبستگی مثبت بین تعداد ریشه و درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی و میانگین طول ریشه با معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد را نشان داد. همچنین رابطه‌ی همبستگی بین طول ریشه با صفات درصد باززایی، تعداد و میانگین طول برگ و تعداد ریشه (در سطح احتمال 1 درصد) مشاهده شد (جدول 9).

در مقابل تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin، صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin، صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر Kin هیچ کالوسی وارد مرحله‌ی باززایی نشد و میزان باززایی این تیمارها برابر با صفر شد. نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که در عدم حضور NAA در هر سه غلظت 0/5، 1 و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin باززایی اتفاق نیفتاده است. در غلظت 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA با افزودن 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin میزان باززایی تا 50 درصد افزایش یافت و با بالا رفتن غلظت Kin از 0/5 به 1 میلی‌گرم در لیتر میزان باززایی به 75 درصد افزایش یافت اما با بیشتر شدن غلظت Kin تا 1/5 میلی‌گرم در لیتر میزان باززایی به 50 درصد کاهش یافت. در غلظت 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر Kin باززایی مشاهده نشد. با افزودن 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin به محیط کشت و سپس افزایش غلظت آن از 0/5 میلی‌گرم در لیتر به 1 و 1/5 میلی‌گرم در لیتر به ترتیب میزان باززایی 25، 50 و 75 درصد شد (جدول 8). نتایج مربوط به همبستگی نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد را بین درصد باززایی و تعداد و میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه نشان داد. همچنین علاوه بر روابط همبستگی فوق، رابطه‌ی همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد بین درصد باززایی با درصد کالوس‌زایی مشاهده شد (جدول 9). بالاترین تعداد برگ در تیمار شاهد با 5 برگ مشاهده شد که با تیمارهای 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد برگ نداشت. بیشترین میانگین طول برگ مربوط به تیمار 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin با میانگین 2/5 سانتی‌متر شناخته شد که با تیمار شاهد با

جدول 7- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی

Table 7- Analysis of variance for different concentration of NAA and Kin combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squares	
		درصد باززایی Percent of Regeneration	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter
NAA	2	16.04**	0.16ns
Kin	3	2.00**	0.08ns
Kin × NAA	6	13.07**	0.25ns
اشتباه آزمایش Error	36	0.08	0.17
ضریب تغییرات (%) CV (%)	-	11.54	31.47

ns و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال 1%

ns and **: Non Significant and significant in 1% level, respectively

جدول 8- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه

Table 8-- Mean comparison of the effects of different concentrations of NAA and Kin combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root

غلظت NAA (mg/l) NAA Concentration	غلظت Kin (mg/l) Kin Concentration	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس (Cm) Average of Callus Diameter	درصد باززایی Percent of Regeneration	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ (Cm) Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه (Cm) Average Length of Roots
0	0	100 ^a	7.5 ^a	75 ^a	5 ^a	2 ^a	2 ^b	1 ^b
	0.5	25 ^d	3b ^c	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d
	1	50 ^c	3.5 ^{bc}	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d
	1.5	100 ^a	7.5 ^a	0 ^d	0 ^d	0 ^d	1 ^c	0.2 ^c
0.3	0	75 ^b	2 ^{bc}	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d
	0.5	75 ^b	7 ^a	50 ^b	2 ^b	0.7 ^{ab}	5 ^a	1 ^b
	1	50 ^c	3 ^{bc}	75 ^a	3 ^{ab}	1.2 ^{ab}	3 ^{ab}	2.5 ^a
	1.5	100 ^a	4.5 ^{ab}	50 ^b	1 ^c	0.5 ^{ab}	1 ^c	1 ^b
0.6	0	75 ^b	4 ^b	0 ^d	0 ^d	0 ^b	0 ^d	0 ^d
	0.5	100 ^a	6.5 ^{ab}	25 ^c	1 ^c	0.5 ^{ab}	0 ^d	0 ^d
	1	100 ^a	7.5 ^a	50 ^d	1 ^c	0.7 ^{ab}	7 ^a	1 ^b
	1.5	100 ^a	7 ^a	75 ^a	3 ^{ab}	2.5 ^a	4 ^a	0.2 ^c

میانگین‌هایی با حروف یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری (در سطح احتمال 1٪) با یکدیگر ندارند.

Numbers followed by the same letter in each Column are not significantly different

جدول 9- همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه در غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و Kin در لاله واژگون

Table 9- Correlation between callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root in study of different concentrations of Kin and NAA combinations

منابع تغییرات Source of Variations	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration Percent	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه Average Length of Roots
درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	1						
میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	0.307**	1					
درصد باززایی Regeneration Percent	0.314**	0.064	1				
تعداد برگ Number of Leafs	0.101	0.172	0.525**	1			
میانگین طول برگ Average length of Leafs	0.221	0.360*	0.711**	0.676**	1		
تعداد ریشه Number of Roots	0.418**	0.098	0.399**	0.013	0.100	1	
میانگین طول ریشه Average Length of Roots	0.031	0.088	0.552**	0.401**	0.370**	0.435**	1

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1٪

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

لیتر NAA + 0/3 میلی گرم بر لیتر BA) و 2/87 سانتی متر (0/3 میلی گرم بر لیتر NAA + صفر میلی گرم بر لیتر TDZ) اختلافی نداشتند اما در آزمایش سوم، بیشترین قطر کالوس 7/5 سانتی متر در محیط حاوی 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA به همراه یک میلی گرم بر لیتر Kin به دست آمد که نسبت به سه آزمایش دیگر بیشتر بود. با توجه به این نتایج می توان ترکیب هورمونی NAA و Kin را بهترین تیمار هورمونی برای کالوس زایی در لاله واژگون دانست. با توجه به نتایج به دست آمده وجود یک سایتوکینین برای باززایی گیاهچه از کالوس ها ضروری می باشد و در هر سه آزمایش در محیط های فاقد سایتوکینین، باززایی صورت نپذیرفت. همچنین کینتین تنها در حضور NAA قادر به باززایی می باشد ولی BA و TDZ به تنهایی نیز می توانند سبب باززایی گیاهچه گردند. بر اساس نتایج این پژوهش، بهترین محیط برای باززایی از کالوس محیط کشت حاوی مقادیر پایین NAA (0/3 میلی گرم بر لیتر) به همراه TDZ (0/1 میلی گرم بر لیتر) است.

سپاسگزاری

این پژوهش با اعتبارات و امکانات گروه علوم باغبانی دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی به اجرا در آمده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد.

در بررسی تأثیر هورمون های NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، باززایی و قطر کالوس ضرورت حضور NAA در محیط‌های حاوی Kin به منظور باززایی مشاهده شد. بررسی اثر تیمارهای NAA و Kin در مقایسه با تیمار NAA و BA نشان داد که میانگین درصد کالوس‌زایی و باززایی در تیمار NAA و BA کمی بالاتر از این میزان در تیمار NAA و Kin بود.

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده از سه آزمایش فوق، مشخص می گردد که بین ترکیب های هورمونی مختلف NAA با انواع سایتوکینین ها، بر شاخص درصد کالوس زایی، تفاوتی مشاهده نمی گردد، به طوری که در هر سه آزمایش، در محیط های حاوی 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA به همراه تمام غلظت های سایتوکینین ها، بیشترین میزان کالوس زایی (100 درصد) مشاهده شده است. البته لازم به ذکر است که هرچند در محیط کشت های فاقد تنظیم کننده رشد، شاهد تولید کالوس می باشیم اما برای رسیدن به حداکثر تولید کالوس نیاز به افزودن NAA به عنوان یک اکسین به محیط کشت داریم. در زمینه شاخص قطر کالوس، نتایج به دست آمده از سه آزمایش نشان می دهد که بیشترین قطر کالوس به دست آمده در آزمایش اول و دوم به ترتیب 2/5 سانتی متر (در تیمارهای صفر میلی گرم بر لیتر NAA + یک میلی گرم بر لیتر BA و 0/6 میلی گرم بر

منابع

- 1- Eslam Zade N., Hosseini S.M., and Moradi H.R. 2010. The Study of *Fritillaria imperialis* Site by Ellenberg Table. Journal of Sciences and Techniques in Natural Resources, 1:83-93 (In Persian with English abstract).
- 2- Hamidoughlou S. 2011. Study on explant types and plant growth regulators on in vitro propagation of *Fritillaria imperialis* L.. MS Thesis, University of Mohaghegh Ardabili.
- 3- Babaoglu M., and Yorgancilar M. 2000. TDZ-specific plant regeneration in Salad Burnet. Plant Cell Plant Cell Tissue Organ Culture, 440: 31-34.
- 4- Bagheri A., and Saffari M. 2009. *in vitro* culture of higher plants. Ferdowsi University of Mashhad, 406.
- 5- Bonyanpour A., and Khosh-Khui M. 2013. Callus Induction and Plant Regeneration in *Punica granatum* L. 'Nana' from Leaf Explants. Journal of Central European Agriculture, 14: 75-83.
- 6- Brasileiro A.C.R., Willadino L., Carvalheira G.G., and Guerra M. 1999. Callus induction and plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. IPA 5) via anther culture. Ciencia Rural, 29: 619-623.
- 7- Chaudhury A., and Qu R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tissue Organ Culture, 60: 113-120.
- 8- Chengalrayan K., and Gallo-Meagher M. 2001. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of Sugarcane. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37: 434-439.
- 9- De Hertogh A., and Lenard M. 1993. The Physiology of Flower Bulbs.
- 10- Dominov J.A., Stenzler L., Lee S., Schwarz J.J., Leisner S., and Howell S.H. 1992. Cytokinins and Auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. Plant cell, 4: 451-461.
- 11- Fratini R., and Ruiz M.L. 2002. Comparative study of different Cytokinins in the induction of morphogenesis in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 46-51.
- 12- Gulshan T.M., Varghese D.R., and Sharma D.R. 1981. Studies on anther cultures of Tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. Biologia Plantarum, 23: 414-420.

- 13- Hao Z., Dai D., Wang J., Wu X., and Liu M. 2013. Callus induction and plant regeneration from anther walls in *Ziziphus jujuba* Mill. Journal of Food, Agriculture and Environment, 11: 405 – 409.
- 14- Hebert J., Touchell V., Ranney R., and LeBude V. 2010. In Vitro Shoot Regeneration and Polyploid Induction of *Rhododendron Fragrantissimum* Improved'. Hortscience, 45: 801–804.
- 15- Hernandez L., Celestino C., and Toribio M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 21: 759-764.
- 16- Hutchinson M. J., Onamu R., Kipkosgei L., and Obukosia D. 2010. Effect of Thidiazuron, NAA and BAP on in vitro Propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Rosita' from shoot tip explants. Journal of Agriculture and Crop Sciences, 12: 60-68.
- 17- Khorrami Raad M., Bohluli Zanjani S., Shoor M., Hamidoghli Y., Ramezani sayyadd A., Kharabian-Masouleh A., and Kaviani B. 2012. Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiole explants of *Anthurium andreanum* Linden (Casino and Antadra). Agriculture and Crop Science, 6: 928-937.
- 18- Kondamudi R., Vijayalakshmi V., and Sri Rama Murthy K. 2010. Induction of Morphogenetic Callus and Multiple Shoot Regeneration in *Ceropegia pusilla* Wight and Arn. Biotechnology, 9: 141-148.
- 19- Mohammadi Dehcheshme M., Khalighi A., and Naderi R. 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1875- 1879.
- 20- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-479.
- 21- Sunderland N., and Wells B. 1968. Plastid structure and development in green callus tissues of *Oxalis dispar*. Annals of Botany, 32: 327-346.
- 22- Witomska M., and Lukaszewska A. 1997. Bulblet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. Acta Horticulturae, 430:331–338.



Effect of Plant Growth Regulators on Callogenesis and Regeneration Of *Fritillaria imperialis* L.

Es. Chamani^{1*} - M. Ghamari² - M. Mohebodini³ - A.R. Ghanbari⁴ - H.R. Heydari⁵

Received: 26-11-2016

Accepted: 30-06-2017

Introduction: Crown imperial (*Fritillaria imperialis* L.) is an ornamental and medicinal plant native to mountainous regions of Iran. This plant genetic resources is in danger of extinction, because of grazing livestock and pest outbreaks. However, due to slow reproduction in natural conditions and traditional multiplication methods such as scaling and Bulb division, many species of this genus are endangered. Using of biotechnology, namely in vitro plant propagation, is a solution to the problems of reproduction of rare and endangered plant species with difficult propagation and mass production of valuable genotypes. Therefore, micropropagation of *F. imperialis* through in vitro regeneration is essential for conservation and commercial production.

Material and Methods: The bulbs of *F. imperialis* in dormancy stage obtained from Ilam mountainous regions in Iran and they were placed in wet vermiculite at 4 °C for 4-6 weeks. Then, Bulbs were surface-sterilized with 70% ethanol for 60s followed by immersion in 5% (v/v) NaOCl solution for 20min with gentle agitation, and they rinsed three times in sterile double distilled water. Explants prepared from the lower third of scales with basal plate and were placed in MS basal medium supplemented with different concentrations of NAA and 2,4-D for callus induction. Test tubes with bulb segments were maintained within 25±2°C in growth chamber at 16 hours light period by the illumination from white florescent tube light and 8 hours dark. After two months callus were transferred to MS basal medium without PGRs. Then, callus excised to 0.5 cm pieces and were transferred to MS basal medium supplemented with NAA in 0, 0.3 and 1 mg/l concentration. Three types of cytokinins with different concentrations were arranged in three separated experiments. The first experiment medium contained NAA with BA (0, 0.3, 0.5 and 1 mg/l), the second experiment NAA combined with 0, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/l TDZ and the third experiment MS basal medium included NAA with Kin (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l). After three months, percentage of callogenesis, diameter of calli, percentage of regeneration, number of leaves and roots and length of leaves and roots were measured. This experiment were carried out in completely randomized design with 4 replications.

Results and Discussion: In the first experiment application of NAA and BA on in-vitro multiplication of *F. imperialis* were evaluated. Highest callogenesis and formation (100 %) was observed in mediums contained 0.3 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 0.6 mg/l NAA + (0.3, 0.5 and 1 mg/l) BA. Also, callogenesis was obtained in medium contained 0.5 mg/l BA without NAA. This result showed that only in medium supplemented with 1 mg/l BA provided highest (100%) callogenesis, when NAA concentrations were low. However, high levels of NAA (0.6 mg/l) in all concentrations of BA were obtained maximum callogenesis. We concluded that NAA is essential for callogenesis and enhancing its levels can increase callogenesis. Also, application of low levels of BA (0.4 µM) in callogenesis mediums of *Cynodon dactylon* contained Auxins resulted in increment of embryogenetic calli formation. In the other hand, presence of BA is essential for plantlet regeneration, however NAA is not necessary. Plantlet regeneration was obtained in PGRs free medium. Statistical analysis of results showed that different concentrations of BA and NAA had significant effects on percentage of callogenesis, diameter of calli, percentage of regeneration, length of leaves and roots ($P<0.01$) and number of leaves and roots ($P<0.05$). Mean comparison showed that maximum number of leaves (17 leaf in each treatment) and length of leaves (4cm) obtained in media supplemented with 0.3 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA. Correlation between the number of leaves and other traits such as diameter of callus and length of leaves ($P<0.01$) and regeneration ($P<0.05$) was significant.

In the second experiment, application of NAA and TDZ on in-vitro multiplication of *F. imperialis* were evaluated. Analysis of variance showed that maximum callogenesis obtained in medium supplemented with 0.3 mg/l NAA + 0.5 mg/l TDZ and 0.6 mg/l NAA in all TDZ levels (0.1, 0.3 and 0.5 mg/l). The combination of 0.6 mg/l NAA with all concentrations of TDZ resulted in maximum (100 %) callogenesis. Highest diameter of calli was obtained in medium contained 0.6 mg/l NAA without TDZ. Best plantlet regeneration was observed in

1, 2, 3, 4 and 5- Professor, Grajuated MSc Student, Associate Professors and Ph.D Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Respectively
(*-Corresponding Author Email: echamani@uma.ac.ir)

media contained 0.3 mg/l NAA + 0.3 mg/l TDZ.

In the third experiment, application of NAA and Kin on in-vitro multiplication of *F. imperialis* were evaluated. Statistical analysis showed the highest callogenesis in medium supplemented with 1.5 mg/l Kin, 0.3 mg/l NAA + 1.5 mg/l Kin, 0.6 mg/l NAA + 0.5 mg/l Kin, 0.6 mg/l NAA + 1 mg/l Kin, 0.6 mg/l NAA + 1.5 mg/l Kin.

Conclusion: The results of this study show the similarity of callus proliferation in all experiments. In all experiments, medium supplemented with 0.6 mg/l NAA plus all cytokinin concentrations showed the highest rate of callogenesis. The highest callus diameter (7.5 cm) was obtained in third experiment (0.6 mg/l NAA + 1 mg/l Kin), while callus diameter in the first (1 mg/l BA and 0.6 mg/l NAA + 0.3 mg/l BA) and the second (0.3 mg/l NAA) experiments was measured 2.5 and 2.87 cm, respectively. Regeneration results indicated that Cytokinin is necessary for plantlet regeneration. Plant regeneration occurred only in medium contained both of kin and NAA, while BA and TDZ could regenerate plantlets from Callus independent of NAA presence.

Keywords: BA, Cytokinin, in vitro Condition, Ornamental Plant, TDZ



تعیین زمان برداشت و عمر انبارمانی مناسب میوه نارنگی کینو در شهرستان جیرفت

سید مهدی میری^{1*} - میثم سالاری² - احمد احمدپور³

تاریخ دریافت: 1394/02/07

تاریخ پذیرش: 1396/04/13

چکیده

مرکبات جزو میوه‌های نافرازگرا بوده و زمان برداشت و طول دوره انبارمانی می‌تواند تاثیر زیادی بر کیفیت میوه داشته باشد. این آزمایش به منظور بررسی خصوصیات کمی و کیفی میوه‌های برداشت شده نارنگی کینو در پانزدهم آذر، سیام آذر، پانزدهم دی، سیام دی و پانزدهم بهمن پس از 30-90 روز انبار خنک در دمای 4-6 درجه سانتیگراد در یکی از باغات شهرستان جیرفت اجرا گردید. نتایج نشان داد که برهمکنش زمان برداشت و مدت انبارمانی بر روی وزن میوه، گوشت، تفاله و عصاره و همچنین مواد جامد محلول (TSS)، اسید قابل تیتر (TA) و TSS/TA در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار گردید. تأخیر در برداشت باعث افزایش صفاتی از قبیل میزان وزن میوه، TSS و TSS/TA شد و بیشترین میزان TSS و TSS/TA مربوط به برداشت میوه‌ها در 15 بهمن بود. با افزایش دوره انبارمانی، درصد کاهش وزن میوه‌ها افزایش یافت. در مجموع، تاریخ برداشت پانزدهم بهمن بهترین زمان برداشت جهت انبارداری میوه نارنگی کینو در جیرفت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انبارداری، کیفیت میوه، مواد جامد محلول، وزن میوه

مقدمه

(Willowleaf) و کینگ (King) می‌باشد و رقمی پررشد، بدون تیغ، مقاوم به سرما، پرمحصول، سال‌آور و میان‌رس تا دیررس است. میوه پوست نازک و چسبیده به گوشت اما با قابلیت پوست‌گیری آسان، ناصاف و بذردار و گوشت آن سفت، پر آب، شیرین با عطر عالی است که نگهداری بسیارخوبی روی درخت و در انبار دارد.

رسیدن میوه مرکبات با توجه به شرایط محیطی و رقم از اواخر پاییز تا بهار خواهد بود. مرکبات از میوه‌های نافرازگرا محسوب شده و پس از رسیدن کامل باید برداشت شوند (13). برداشت میوه در زمان مناسب منجر به افزایش عمر انبارمانی و حفظ کیفیت آن می‌شود (7). از طرفی باقی ماندن محصول پس از رسیدن روی درخت موجب افزایش پوسیدگی، بد طعمی، گرانوله شدن و یا پفکی شدن میوه و کوتاه شدن عمر انبارداری می‌شود. در این حالت پوست میوه ضخیم‌تر شده و در انبار از گوشت جدا می‌شود و میزان عصاره قابل استخراج میوه به دلیل تشکیل ژل در آبدانک میوه به شدت کاهش و سخت و سفید شدن کیسه‌های محتوی آب میوه افزایش می‌یابد. میوه‌هایی که زود برداشت شده‌اند نیز مستعد آسیب سرمازدگی هستند (11) و (13). بنابراین کیفیت میوه، مدت انبارمانی، ابتلا به ناهنجاری‌ها و بیماری‌های گوناگون در مرکبات تابع عوامل گوناگون از جمله زمان مناسب برداشت می‌باشد (4). مناسبترین زمان برداشت به نسبت TSS به TA بستگی دارد و شاخص‌های دیگری مانند میزان آب میوه،

مرکبات گروه بزرگی از میوه‌ها و شامل انواع پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck نارنگی (*C. reticulata* Blanco)، لیموشیرین (*C. aurantifolia* (Chrism.) Swingle)، گریپ فروت (*C. limettioides* Tan.) و پوملو (*C. grandis* (L.) Osbeck) است. تولید مرکبات در مناطق مختلف جهان و میزان بالای تولید آن موجب شده که این محصول در جهان از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار باشد، بطوریکه امروزه در تجارت جهانی، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه محسوب می‌شود (12). یکی از مناطق مرکبات‌خیز ایران، استان کرمان است که در برخی نواحی آن از جمله دشت جیرفت و دامنه‌های آن پرتقال، گریپ فروت، لیموشیرین، لایم و نارنگی کشت می‌شود. از ارقام مهم کشت شده نارنگی در این منطقه می‌توان نارنگی کینو (Kinnow) را نام برد که در کشورمان معروف به پاکستانی است. نارنگی کینو دورگ ویلولیف

1 و 2- استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد کرج

(*)= نویسنده مسئول: Email: smmiri@kiau.ac.ir

3- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی جیرفت و کهنوج

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.45534

ضریب تشابه (به روش پیرسون) با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 1 و 5 درصد صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل تاریخ برداشت و زمان انبارداری بر کلیه صفات مورد اندازه گیری بجز سه صفت در سطح احتمال 1 درصد معنی دار بوده و در تغییر وزن میوه فقط زمان برداشت و در صفت کاهش وزن میوه و وزن پوست فقط زمان انبارداری تاثیر معنی‌داری داشته است.

وزن میوه

وزن میوه‌های برداشت شده از 15 آذر تا 15 دی ماه ثابت بوده و اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند اما میوه‌هایی که در 30 دی و 15 بهمن ماه برداشت شدند وزنشان بیشتر بوده و بترتیب 12/5 و 14/3 درصد افزایش وزن میوه نسبت به برداشت 15 آذر نشان دادند (جدول 1). بین (1) در پژوهشی بر روی تغییرات مورفولوژیکی میوه‌های در حال نمو پرتقال والنسیا گزارش کرد رشد و نمو میوه را می‌توان به سه دوره تقسیم کرد و در مرحله سوم (بلوغ میوه)، رشد میوه تا زمانی که بر روی درخت باقیست ادامه دارد اما نسبت به مرحله دوم بسیار کمتر می‌باشد. در تایید این مطلب مطابق جدول 2، وزن گوشت و تفاله و آب میوه نیز در این دو تاریخ برداشت بیشتر بوده که در نهایت منجر به افزایش وزن میوه گردید. مشابه نتایج تحقیق حاضر، اقبال و همکاران (9) عنوان کردند وزن میوه های نارنگی کینو تا 30 ژانویه (10 بهمن) الی 11 فوریه (22 بهمن) افزایش می‌یابد. رائس و همکاران (16) نیز دریافتند میوه‌های گلابی که در اواخر سپتامبر (برداشت سوم و آخر) برداشت شده بودند وزن و آب بیشتری داشتند.

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش تاریخ برداشت و زمان انبارداری (جدول 2) نشان می‌دهد با افزایش مدت انبارداری در زمان‌های مختلف برداشت میوه‌ها، وزن میوه ثابت (برداشت اول، دوم و سوم) یا کاهش (برداشت چهارم و پنجم) داشته است. همچنین افزایش مدت انبارداری باعث افزایش معنی‌دار کاهش وزن میوه‌ها گردید، به طوریکه میوه‌های انبار شده به مدت 90 روز 16/5 درصد کاهش وزن داشتند در حالیکه این میزان در میوه‌هایی که 30 روز در انبار قرار داشتند 3/5 درصد بود (شکل 1) که بخاطر از دست دادن آب می‌باشد (5). سینگ و اسرینیواسولا ردی (18) مشاهده کردند میوه‌های پرتقالی که بمدت 17 روز در سردخانه قرار داشتند 7/3 درصد کاهش وزن نشان دادند. بیشترین میانگین وزن میوه (121/8 گرم) متعلق به زمان برداشت 30 دی و مدت انبارداری 30 روز و کمترین وزن میوه

اندازه، رنگ، عطر و طعم میوه نیز حائز اهمیتند (13). اقبال و همکاران (9) دریافتند زمان برداشت بر خصوصیات فیزیکی-شیمیایی میوه همچون اندازه، وزن و TSS میوه ارقام Feutrell's early و Kinnow نارنگی موثر است. همدانی و همکاران (7) نیز مناسب‌ترین زمان برداشت میوه پرتقال خونی رقم مورو را زمان رسیدن کامل میوه (بلوغ تجارتي) اعلام کردند.

نارنگی کینو در جیرفت بطور معمول از آبان تا بهمن ماه برداشت می‌شود. با توجه به مصرف زیاد نارنگی کینو در شب عید که معمولاً از کشورهای خارج وارد می‌شود، هدف از اجرای این پروژه تعیین مناسب‌ترین زمان برداشت میوه در شرایط آب و هوایی جیرفت در جهت بهبود کیفیت و افزایش بازارپسندی و عمر انبارداری این محصول تا ایام نوروز می‌باشد.

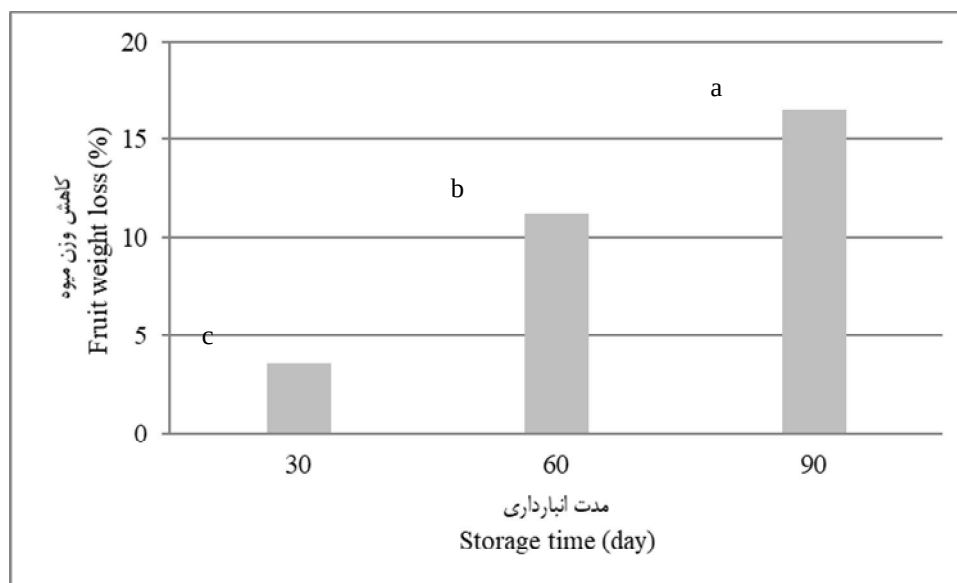
مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال 1390 در یک قطعه باغ نارنگی کینو (*Citrus reticulate* Blanco cv. Kinnow) پیوندی روی پایه نارنج واقع در مرکز تحقیقات کشاورزی جیرفت و کهنوج انجام شد. ارتفاع مرکز از سطح دریا 627 متر، طول جغرافیایی 57 درجه و 25 دقیقه شمالی، عرض جغرافیایی 27 درجه و 30 دقیقه شرقی، متوسط بارندگی سالیانه 130-140 میلی متر، رطوبت نسبی 55 تا 65 درصد، حداکثر درجه حرارت 48 درجه سانتیگراد، حداقل درجه حرارت یک درجه سانتیگراد و میانگین درجه حرارت 35 درجه سانتیگراد می‌باشد. از درختان 10 ساله و هم اندازه در شرایط مشابه، میوه‌های سالم و یکنواخت از بخش‌های مختلف درخت در 5 زمان 15 آذر، 30 آذر، 15 دی، 30 دی و 15 بهمن در سبدهای پلاستیکی جداگانه برداشت شد. سپس میوه‌ها در سردخانه با دمای 4-6 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 85 درصد به مدت 90 روز انبار شده و تعداد سه میوه از هر تکرار (جعبه) انتخاب و از نظر صفات کمی و کیفی هر 30 روز یکبار مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات وزن میوه، پوست، گوشت، تفاله و آب میوه توسط ترازوی حساس، تغییر (کاهش یا افزایش) وزن میوه بر اساس اختلاف وزن اندازه گیری شد. pH عصاره میوه با استفاده از pH متر، میزان مواد جامد محلول کل (TSS) بر حسب درجه بریکس با استفاده از رفراکتومتر دستی در دمای 20 درجه سانتی گراد و اسیدیته قابل تیتر (TA) بر حسب اسید سیتریک با استفاده از سود 0/1 نرمال انجام گرفته و بر اساس آن نسبت TSS/TA محاسبه گردید.

تجزیه داده‌های اندازه گیری شده بصورت طرح کرت‌های خرد شده بر اساس طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. عامل زمان برداشت در 5 سطح بعنوان عامل اصلی و مدت نگهداری در سردخانه در 3 سطح بعنوان عامل فرعی قرار گرفتند. تجزیه داده‌ها و

وزن گوشت، تفاله، آب و پوست میوه
میوه‌های برداشت 30 دی با انبارداری 30 روزه دارای وزن گوشت و تفاله بیشتری (بترتیب 89/6 و 52/3 گرم) بودند (جدول 1) و این دو صفت با هم و نیز با وزن میوه همبستگی مثبت معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد نشان دادند (جدول 3).

(85/3-8/4 گرم) متعلق به زمان برداشت 30 آذر در کلیه زمان‌های انبارداری و برداشت 15 بهمن با مدت انبارداری 90 روز می‌باشد (جدول 2).



شکل 1- اثر مدت انبارداری بر کاهش وزن میوه نارنگی کینو

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن نمی‌باشند

Figure 1- Effect of storage time on fruit weight loss of Kinnow mandarin.

Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) based on Duncan's multiple range test.

جدول 1- اثر زمان برداشت بر تغییر وزن میوه نارنگی کینو در طی انبارمانی

Table 1- Effect of harvesting date on fruit weight change of Kinnow mandarin during storage

زمان برداشت Harvesting date	تغییر وزن میوه Fruit weight change (%)
15 آذر 6 December	0* b
30 آذر 21 December	+2 b
15 دی 5 January	+4.3 b
30 دی 20 January	+12.5 a
15 بهمن 4 February	+14.3 a

*: درصد تغییر وزن میوه نسبت به برداشت اول (15 آذر) محاسبه گردید.

*: Fruit weight change (%) was compared to the first harvest (6th December)

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) based on Duncan's multiple range test

جدول 2- اثر زمان برداشت و مدت انبارداری بر خصوصیات کمی و کیفی میوه نارنگی کینو

Table 2- Effect of harvesting date and storage period on the quantity and quality of Kinnow mandarine fruit

زمان برداشت Harvesting date	مدت انبارداری Storage period (day)	وزن میوه Fruit weight (g)	وزن گوشت Meat weight (g)	وزن تفاله Pulp weight (g)	وزن آب Juice weight (g)	TSS (%)	TA (%)	TSS/TA	pH
15 آذر 6 December	30	90.5 bc	76.7 a-d	42.2 b-d	30.3 bc	8.7 d	1.53 ab	5.7 e	3.15 e-g
	60	89.0 bc	67.9 cd	37.1 cd	31.7 bc	10.5 bc	1.57 a	6.7 de	3.05 fg
	90	91.5 bc	72.0 b-d	36.7 cd	35.3 bc	10.8 a-c	1.33 a-d	8.2cd	3.36 a-e
30 آذر 21 December	30	86.1 c	66.5 cd	43.9 d	31.3 bc	9.2 d	1.39 a-d	6.7 de	3.30 b-f
	60	85.4 c	64.6 cd	34.1 d	30.5 bc	9.8 cd	1.49 a-c	6.6 de	3.22 c-g
	90	85.3 c	62.3 d	34.2 d	28.1 c	10.8 a-c	1.18 d	9.2 a-c	3.52 a
15 دی 5 January	30	96.4 bc	69.4 bd	40.3 b-d	29.1 c	10.5 bc	1.52 a	6.7 de	3.21 d-g
	60	100.3 bc	75.2 a-d	42.0 b-d	33.2 bc	11.4 ab	1.21 d	9.3 a-c	3.43 a-c
	90	94.0 bc	68.3 cd	39.8 cd	30.5 bc	11.7 a	1.17 d	9.4 ab	3.06 g
30 دی 20 January	30	121.8 a	89.6a	52.3 a	37.3 a-c	10.4 bc	1.28 b-d	8.4 b-d	3.50 ab
	60	110.1 ab	80.0 a-c	47.9 ab	32.0 bc	11.5 ab	1.24 cd	9.2 a-c	3.48 ab
	90	97.8 bc	70.5 b-d	32.6 b-d	27.8 c	11.4 ab	1.17 d	9.9 a-c	3.21 b-g
15 بهمن 4 February	30	110.8 ab	85.4 ab	46.3 a-c	45.2 a	11.6 ab	1.16 d	10.3 a	3.42 a-d
	60	98.7 bc	74.1 a-d	43.2 b-d	30.9 bc	11.8 a	1.20 d	10.2 ab	3.06 g
	90	86.4 c	66.7 cd	33.6 d	33.1 bc	11.8 a	1.19 d	10.0 ab	3.26 c-g

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) based on Duncan's multiple range test.

آذر و انبارداری 90 روز) متغیر بود. تغییرات pH عصاره میوه در مراحل مختلف رسیدن و زمان‌های انبارداری از الگوی ثابتی پیروی نکرد با اینحال در بعضی موارد با گذشت زمان نگهداری تا حدودی افزایش یافت که می‌تواند بیانگر اکسیداسیون اسیدهای آلی در طی انبارمانی باشد (10).

مواد جامد محلول کل (TSS)

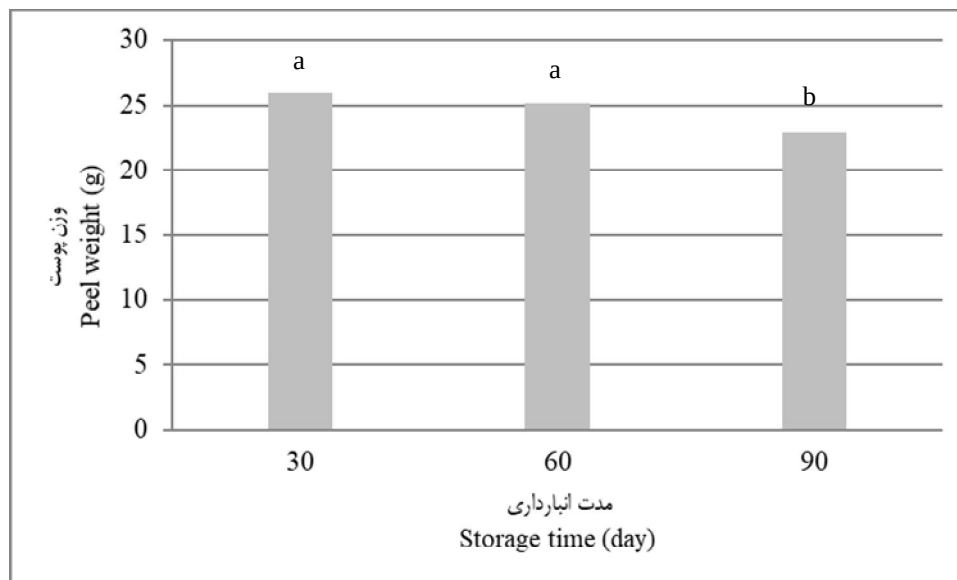
بیشترین مقدار TSS مربوط به تاریخ برداشت 15 دی با انبارداری 90 روز (11/7 درصد) و برداشت 15 بهمن با انبارداری 60 و 90 روز (11/8 درصد) و کمترین آن مربوط به تاریخ برداشت 15 آذر و مدت انبارداری 30 روز (8/7 درصد) بود. تغییرات TSS با گذشت زمان انبارمانی صعودی بوده که احتمالاً دلیل آن هیدرولیز نشاسته و افزایش ساکارز می باشد (2) هرچند که افزایش TSS در طی انبارمانی نمی‌تواند فقط مربوط به افزایش قندهای ساده باشد (12). این نتایج مطابق یافته‌های اشوری و اسماعیل (2) و بر خلاف گزارش همدانی و همکاران (7) می‌باشد. همزمان با فرایند رسیدن میوه میزان TSS نیز افزایش یافت بطوریکه بیشترین میزان آن در زمان برداشت بلوغ کامل میوه مشاهده شد. افزایش میزان درصد TSS در طی رسیدن میوه بر روی آلو (6)، انبه (10)، پرتقال (7)، نارنگی (9)، گلابی (16) و گیلان (17) نیز گزارش شده است.

با افزایش مدت انبارمانی از 60 به 90 روز، وزن پوست میوه کاهش یافت بطوریکه بیشترین میانگین وزن پوست با انبارداری 30 و 60 روز (بترتیب 25/9 و 25/2 گرم) و کمترین آن با انبارداری 90 روز (22/9 گرم) بدست آمد (شکل 2) و به علت این است که تخریب از سطح پوست پس از برداشت نیز ادامه می‌یابد (5). سینگ و اسرینیواسولا ردی (18) اظهار داشتند نیروی کششی و قابلیت ارتجاعی پوست پرتقال در طی انبارمانی به علت کاهش رطوبت پوست کمتر می‌گردد.

میوه‌هایی که در 30 دی و 15 بهمن برداشت شدند وزن آب بیشتری داشتند بطوریکه بیشترین میانگین وزن آب میوه متعلق به تیمار زمان برداشت 15 بهمن با مدت انبارداری 30 روز (45/2 گرم) و کمترین آن متعلق به زمان برداشت 30 دی با مدت انبارداری 90 روز (27/8 گرم)، 30 آذر با مدت انبارداری 90 روز (28/1 گرم) و 15 دی با مدت انبارداری 30 روز (29/1 گرم) می‌باشد. عثمان (14) نیز بالاترین محتوای رطوبت میوه پایا را در میوه های اواخر فصل گزارش کرد.

pH آب میوه

pH عصاره میوه در محدوده 3/06 (برداشت 15 دی و انبارداری 90 روز و برداشت 15 بهمن و انبارداری 60 روز) تا 3/52 (برداشت 30



شکل 2- اثر مدت انبارداری بر وزن پوست میوه نارنگی کینو

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.01$) با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن نمی باشند

Figure 2- Effect of storage time on fruit peel weight of Kinnow mandarin

Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) based on Duncan's multiple range test.

جدول 3- ضریب همبستگی صفات کمی و کیفی میوه نارنگی کینو

Table 3- Correlation coefficients of qualitative and quantitative characteristics of Kinnow mandarin fruit

صفت Characteristic	وزن میوه Fruit weight	وزن گوشت Meat weight	وزن تفاله Pulp weight	وزن آب Juice weight	وزن پوست Peel weight	pH	TSS	TA	TSS/TA
وزن میوه Fruit weight	1								
وزن گوشت Meat weight	0.95**	1							
وزن تفاله Pulp weight	0.96**	0.88**	1						
وزن آب Juice weight	0.48	0.58*	0.49	1					
وزن پوست Peel weight	0.48	0.53*	0.52*	0.30	1				
pH	0.32	0.26	0.34	0.39	0.03	1			
TSS	0.04	-0.08	0.15	0.20	-0.46	0.06	1		
TA	-0.14	-0.03	-0.19	-0.24	0.49	-0.37	-0.77**	1	
TSS/TA	0.13	0.02	0.21	0.28	-0.47	0.25	0.91**	-0.94**	1

* و **: بترتیب معنی دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد

* and **: Significant at probability level 5 and 1%, respectively

روی درخت، میزان آن کاهش یافت که مطابق یافته‌های همدانی و همکاران (7)، فالیکو و همکاران (3) و گواداراما و پنا (5) است و بدلیل مصرف اسید سیتریک در تنفس و تبدیل آن به مواد دیگر در طول دوره انبارمانی می‌باشد (15). ضمن اینکه رسیدن میوه مرکبات با

اسیدیته قابل تیتراسیون (TA)

در زمان برداشت 15 آذر و مدت انبارداری 60 روز و برداشت 15 دی و مدت انبارداری 30 روز بیشترین اسید قابل تیتر (بترتیب 1/57 و 1/52 درصد) مشاهده شد و در طی دوره انبارمانی و بالغ شدن میوه

میوه‌ها تا زمان 30 آذر الی 15 دی در شرایط آب و هوایی جیرفت هنوز به بلوغ کامل نرسیده‌اند و با توجه به نافرآزگرا بودن مرکبات در انبار نیز از کیفیت مناسبی برخوردار نمی‌باشند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که تاریخ برداشت و مدت انبارمانی بر کمیت و کیفیت میوه نارنگی کینو تأثیر می‌گذارد. تمامی صفات کیفی و اغلب صفات کمی میوه‌های نارنگی کینو با نزدیک شدن به بهمن ماه به تدریج ارتقا یافته و به سطح ایده‌آل خود نزدیک شدند. همچنین بیشترین میزان TSS و آب موجود در میوه مربوط به اواخر فصل برداشت (اواسط بهمن ماه) می‌باشد و تاخیر در برداشت عمر انباری میوه‌ها را کاهش نداد. در مجموع برداشت در بهمن ماه به عنوان بهترین زمان برداشت جهت انبارداری نارنگی کینو در شهرستان جیرفت از لحاظ وزن بیشتر، حفظ کیفیت مطلوب میوه، مدت انبارداری کمتر تا زمان اوج مصرف (ایام نوروز) و هزینه‌های کمتر سردخانه توصیه می‌گردد.

افزایش تدریجی TSS و کاهش اسید کل همراه است (8، 9) و این دو صفت همبستگی منفی معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد ($r = -0/77$) با هم داشتند (جدول 3).

شاخص طعم (TSS/TA)

همانطور که انتظار می‌رود نسبت TSS/TA با میزان TSS همبستگی مثبت ($r = 0/91$) و با TA همبستگی منفی معنی‌داری ($r = -0/94$) دارد (جدول 3). بلحاظ اینکه میوه‌های برداشت شده در زمان بلوغ کامل، TA پایین‌تری داشتند بنابراین شاخص طعم (نسبت TSS/TA) نیز در آنها بیشتر از میوه برداشت شده در پاییز بوده است. همچنین در طی نگهداری میوه‌ها در انبار، میزان TA کاهش و میزان TSS افزایش یافت در نتیجه نسبت TSS/TA در طی انبارمانی افزایش نشان داد. مطابق نتایج مقایسه میانگین، بیشترین میانگین TSS/TA متعلق به تاریخ برداشت 15 بهمن و مدت انبارداری 30 روز (10/3) و کمترین آن (5/7) متعلق به تاریخ برداشت 15 آذر و مدت انبارداری 30 روز می‌باشد (جدول 2). بالا رفتن این نسبت باعث افزایش طعم شیرین در میوه‌ها می‌گردد و میزان TSS/TA مناسب برای برداشت میوه نارنگی 14-8/5 است (13). مطابق نتایج حاصل،

منابع

- Bain J.M. 1958. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. Australian Journal of Botany, 6(1):1-23.
- Echeverria E., and Ismail M. 1987. Changes in sugars and acids of citrus fruits during storage. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 100:50-52.
- Fallico B., Lanza M.C., Maccarrone E., Nicolosi C., and Rapisarda P. 1996. Role of hydroxycinnamic acids and vinylphenols in the flavour alteration of blood orange juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44:2654-2657.
- Fotouhi R., and Fattahi J. 2007. Citrus Growing in Iran. Guilan University Press. (in Persian)
- Guadarrama A., and Peña Y. 2013. Respiratory activity vs. physical and chemical changes in calamondin (*Citrus xmicrocarpa* Bunge) fruits during ripening. Bioagro, 25(1):57-63.
- Guerra M., and Casquero P.A. 2008. Effect of harvest date on cold storage and postharvest quality of plum cv. Green Gage. Postharvest Biology and Technology, 47(3):325-332.
- Hamedani M., Moradi H., and Ghanbari A. 2014. Effect of harvest time and storage on Moro blood orange fruit quality (*Citrus sinensis* cv. Moro). Journal of Horticulture Science, 28(2):252-259. (in Persian with English abstract)
- Iglesias D.J., Cercós M., Colmenero-Flores J.M., Naranjo M.A., Ríos G., Carrera E., Ruiz-Rivero O., Lliso I., Morillon R., Tadeo F.R., and Talon M. 2007. Physiology of citrus fruiting. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19(4):333-362.
- Iqbal M., Niamatullah Khan M., Zafar M., and Munir M. 2012. Effect of harvesting date on fruit size, fruit weight and total soluble solids of Feutrell's Early and Kinnow cultivars of mandarin (*Citrus reticulata*) on the economic conditions of farming community of Faisalabad. Sarhad Journal of Agriculture, 28(1):19-21.
- Khairul Islam M., Khan M.Z.H., Sarkar M.A.R., Absar N., and Sarkar S.K. 2013. Changes in acidity, TSS, and sugar content at different storage periods of the postharvest mango (*Mangifera indica* L.) influenced by bavistin DF. International Journal of Food Science, 2013:1-8.
- Ladaniya M.S. 2003. Citrus: Postharvest cold chain. In R. Dris. et al. (ed.) Crop Management and Postharvest Handling or Horticultural Products. Volume II. Science Publisher.
- Ladaniya M.S. 2008. Citrus Fruit: Biology Technology and Evaluation. Academic Press, USA.
- Miri S.M. 2012. Tropical and Subtropical Fruits. Iran Agricultural Science Publications. (in Persian)
- Othman O.C. 2009. Physical and chemical composition of storage-ripened papaya (*Carica papaya* L.) fruits of

- eastern Tanzania. Tanzania Journal of Science, 35:47-56.
- 15- Rapisarda P., Lo Bianco M., Pannuzzo P., and Timpanaro N. 2008. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotype (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Postharvest Biology and Technology, 49:346-354.
 - 16- Raese J.T., Drake S.R., and Staiff D.C. 1999. Calcium sprays, time of harvest, and duration in cold storage affects fruit quality of d'Anjou pears in a critical year. Journal of Plant Nutrition, 22(12):1921-1929.
 - 17- Serrano M., Díaz-Mula H.M., Zapata P.J., Castillo S., Guillén F., Martínez-Romero D., Valverde J.M., and Valero D. 2009. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 57(8):3240–3246.
 - 18- Singh K.K., and Sreenivasula Reddy B. 2006. Post-harvest physico-mechanical properties of orange peel and fruit. Journal of Food Engineering, 73(2):112–120.



Determining Appropriate Harvesting Date and Storage Life of Kinnow Mandarin Fruits in Jiroft County

S. M. Miri^{1*} - M. Salari² - A. Ahmadpour³

Received: 27-04-2015

Accepted: 04-07-2017

Introduction: Citrus is one of the most commercially important horticultural crops grown in tropical and sub-tropical regions of the world. They are classified as non-climacteric fruits. Harvesting date and storage can influence citrus fruit quality and shelf life. In Iran, some members of citrus family including sweet orange and mandarin are produced as an export crop, so research on fruit quality and storage life is needed. There is no available scientific literature regarding the effect of harvesting date and storage duration on retaining the postharvest physicochemical properties of Kinnow mandarin under cold storage. The main objective of the present study was to evaluate the effect of harvesting date and storing time on shelf life and quality of Kinnow mandarin fruits under Jiroft weather conditions.

Materials and Methods: Investigations were carried out on mandarin (*Citrus reticulata*) cv. Kinnow grafted on sour orange rootstock in an orchard located in Jiroft and Kahnooj Agricultural Research Center, Jiroft, Iran. Fruits were harvested on 6th December, 21th December, 5th January, 20th January and 4th February. After cold storage for 30-90 days at 4-6 °C, the fruit was analyzed for quantitative and qualitative characteristics including weight of fruit, peel, meat, pulp and juice, fruit weight loss, pH, total soluble solids (TSS), titratable acidity (TA) and TSS/TA. Experiment was arranged in a split plot based on randomized complete block design (RCBD). Data analysis and similarity coefficient (Pearson's method) were performed using SPSS.16 software, and means comparison was performed by using Duncan's multiple range test at 1 and 5% probability levels.

Results and Discussion: The results showed that the interaction effect of harvesting date and storage period on the weight of the fruit, meat, pulp and juice and TSS, TA and TSS/TA was significant at 1% probability level. Weight of harvested fruits from 6th December to 5th January was constant, but fruits harvested on 20th January and 4th February were heavier as much as 12.5 and 14.3 percent, respectively, compared to 6th December. Fruit weight loss increased along with the increase in storage time duration, so that mean fruits weight loss percentages were 3.5 and 16.5 at 30 and 90 days of storage, respectively, due to continued transpiration of the fruits after harvesting. As a result of transpiration, water enters into the atmosphere through the pores existing on fruit surface. The greatest fruit weight (121.8 g) was recorded for combination of harvesting on 20th January and 30-day storage. Fruits harvested on 20th January and 30-day storage had higher meat and pulp weight (89.6 and 52.3 g, respectively) and a significant correlation coefficient was detected between them. Changes of fruit juice pH at different stages of fruit ripening and storage times did not follow a fixed pattern, though pH slightly increased in some cases during storage, which can be due to oxidation of citric acid during storage. The maximum TSS was recorded for harvesting on 5th January and 90-day storage (11.7 °Brix) as well as 4th February and 60- and 90-day storages (11.8 °Brix), while the minimum TSS was observed on 6th December and 30-day storage (8.7 °Brix). The results exhibited that TSS content of fruit juice increased when storage period increased, which was possibly attributed to the hydrolysis of starch and increase in sucrose content. However, increase in TSS during storage is not always directly related to changes in the simple sugar content of fruit. During storage and maturation of the fruits on the tree, TA reduced due to the use of citric acid in respiration. Taste index (TSS/TA) in fruits harvested at full maturity was greater than that in fruits harvested in the fall. Besides, TSS/TA increased during storage, so that the highest and lowest average TSS/TA ratios were related to harvesting on 4th February and 30-day storage as well as 6th December and 30-day storage, respectively. According to the results, fruits did not reach full maturity until 5th January under Jiroft weather conditions.

Conclusion: Postharvest quality and shelf life of Kinnow mandarin fruits were affected by harvesting date and storage duration. Delay in harvest resulted in an increase in fruit weight, TSS and TSS/TA. TSS and TSS/TA were higher when fruits harvested on 4th February. Fruit weight loss increased when the storage period increased.

1 and 2- Assistant Professor and MSc Student of Horticulture, Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University

(*- Corresponding Author Email: smmiri@kiauo.ac.ir)

1- Assistant Professor, Jiroft and Kahnooj Agricultural Research Center

Overall, 4th February is the best date to harvest Kinnow mandarin fruit in Jiroft.

Keywords: Fruit quality, Fruit weight, Storage, Total soluble solid



بررسی تاثیر کاربرد اکسید نیتریک بر کاهش اثرات نامطلوب سرما بر میوه پرتقال واشنگتن ناول (*Citrus sinensis* L. cv. Washington Navel) طی انبارداری

بهاره قربانی^{1*} - زهرا پاک کیش²

تاریخ دریافت: 1394/05/10

تاریخ پذیرش: 1395/12/03

چکیده

پرتقال واشنگتن ناول یکی از مهمترین مرکبات در ایران است. میوه پرتقال واشنگتن ناول که در دمای زیر 5 درجه سانتیگراد نگه داشته شود، عارضه فرورفتگی در پوست را به شدت نشان می دهد و افزایش در شدت علائم سرمازدگی با دمای پایین تر و مدت زمان انبارداری طولانی تر، افزایش می یابد. این آزمایش به منظور بررسی اثر اکسید نیتریک، بر کاهش خسارت سرمازدگی و ویژگی های بیوشیمیایی پرتقال رقم واشنگتن ناول طی انبارداری انجام شده است. میوه های این رقم تجاری با غلظت های صفر (شاهد)، 0/25 و 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک تیمار و سپس در دمای 5 ± 1 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 85-90 درصد، به مدت 5 ماه نگهداری شدند و ویژگی های نظیر سرمازدگی، نشت یون، پراکسیداسیون لیپیدها، پراکسید هیدروژن، مواد جامد محلول، اسیدهای آلی، pH، اسیدآسکوربیک و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی (پراکسیداز و کاتالاز) طی 5 ماه انبارداری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد، کاربرد 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک نسبت به شاهد، به طور معنی داری خسارت سرمازدگی، نشت یون، پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن را کاهش و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را افزایش داد. طبق این نتایج، مواد جامد محلول کل، pH، اسیدآسکوربیک میوه های تیمار شده و شاهد در طی دوره انبارداری روند افزایشی و میزان اسیدهای آلی روند کاهشی داشتند، اما استفاده از تیمار اکسید نیتریک، تغییرات دو روند مذکور را نسبت به شاهد کمتر تغییر داد. همچنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی میوه های تیمار شده با اکسید نیتریک نسبت به شاهد، بسیار افزایش یافت. به طور کلی طبق نتایج حاصل از این پژوهش، میوه های تیمار شده با 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک، دارای بالاترین کیفیت و بیشترین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی با کمترین خسارت سرمازدگی بودند.

واژه های کلیدی: انبارداری، آنزیم های آنتی اکسیدانی، پرتقال، اکسید نیتریک

مقدمه

موجب شده است که تنوع بسیاری زیادی در ارقام و گونه های درختان میوه وجود داشته باشد و میوه های تولید شده از کیفیت مناسبی برخوردار باشند (12). پرتقال واشنگتن ناول، به عنوان زودرس ترین رقم پرتقال وارد بازار مصرف می گردد و چون محصول نوبرانه پرتقال است، باغداران بیشتر تمایل به کشت و کار این رقم نشان می دهند. افزایش عمر انباری به منظور افزایش بازارپسندی این رقم حائز اهمیت زیادی می باشد. بنابراین، شرایط قبل از برداشت و بهینه نمودن شرایط بعد از برداشت، تأثیر معنی داری روی کیفیت میوه خواهد داشت (12). حساسیت به دمای پایین با ظهور علائم سرمازدگی از مشکلات عمده پس از برداشت محصولات باغی می باشد. این پدیده باعث محدود کردن عمر انبارداری و کاهش کیفیت محصولات حساس به سرما می گردد. تغییر واکنش های بیوشیمیایی و فیزیولوژی مختلف در داخل میوه به همراه وقوع نابسامانی های ظاهری از علائم سرمازدگی می باشد (22). استفاده از تکنولوژی سردخانه به عنوان

پرتقال (*Citrus sinensis* L.) یکی از بازارپسندترین محصولات کشاورزی است. میوه پرتقال حاوی املاح و سرشار از ویتامین های بسیار زیادی می باشد که جنبه دارویی و غذایی دارد (7) و تولید آن نیز در ایران سابقه تاریخی و طولانی دارد (12). در بین مهم ترین محصولات باغبانی ایران، می توان به انار، انجیر، خرما، پسته، سیب، زردآلو و پرتقال اشاره کرد که ایران در بین کشورهای تولید کننده پرتقال مقام هشتم را دارا می باشد و این جایگاه خوبی در میان کشور های تولید کننده مرکبات می باشد (10). شرایط اقلیمی متنوع ایران

1 و 2- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم باغبانی و استادیار پژوهشکده باغبانی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

(* - نویسنده مسئول: Email: ghorbani.bahareh@gmail.com)

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.48300

باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شدند. به منظور اعمال تیمارها، میوه‌های سالم، یکنواخت و عاری از هر نوع عامل بیماری را انتخاب شدند و با آب معمولی کاملاً شسته تا تمام مواد زایدی که به سطح میوه چسبیده بودند، از آن جدا شوند. سپس میوه‌ها با آب 35 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه شسته شدند تا از هر نوع عامل بیماری‌زایی سطحی تمیز گردند. در نهایت میوه‌ها به طور کامل خشک و با اکسید نیتریک (از ماده ای به نام سدیم نیترو پروساید که آزادکننده نیتریک اکسید هست استفاده شد) تیمار شدند. جهت اعمال تیمار اکسید نیتریک طی 5 ماه برای هر تیمار 250 میوه پرتقال در نظر گرفته شد. برای اعمال تیمار از غلظت‌های 0/5 و 0/25 میلی مولار نیتریک اکسید و آب مقطر (شاهد) به مدت 5 دقیقه با روش غوطه‌ور کردن، استفاده گردید. پس از اعمال تیمار میوه‌ها در سبدهایی به اندازه 35 × 35 × 15 قرار داده شده تا کاملاً خشک شدند. بعد از خشک شدن، به سردخانه با دمای 1±5 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 5±90 درصد (۱۱،۱۹،۲۳) به مدت 5 ماه قرار داده شدند. پس از آن نیز طی فواصل زمانی هر 30 روز یکبار، صفات زیر ارزیابی شدند. طی این آزمایش برای هر سی روز اندازه گیری صفات مورد نظر 10 عدد میوه از هر تکرار استفاده شد و با توجه به تعداد تیمار و تکرار مجموعاً 600 میوه استفاده شد.

سرمازدگی: ارزیابی میزان سرمازدگی در طول 5 ماه نگهداری میوه‌ها در دمای پایین انجام گرفت. وجود لکه‌های فرورفته قهوه‌ای رنگ در سطح میوه به همراه فرورفتگی‌های سطح میوه به عنوان علائم سرمازدگی در نظر گرفته شد. خسارت سرمازدگی به روش (نیل پراپورک) و با فرمول زیر محاسبه گردید (18):

$$100 \times (\text{تعداد کل میوه} / \text{تعداد میوه سرمازده} - \text{تعداد کل میوه}) =$$

درصد خسارت سرمازدگی

نشت یون: به منظور اندازه‌گیری نشت یون هدایت الکتریکی (EC)² محلول حاوی نمونه‌ها (قسمتی از بافت گوشت میوه پرتقال و به طور تصادفی از ده میوه استفاده شد) توسط دستگاه EC متر سنجیده شده که در واقع (EC₁) نمونه‌ها بدست آمد، بعد از سرد شدن نمونه‌ها برای بار دوم هدایت الکتریکی (EC₂) محلول حاوی برش-های جوانه سنجیده شد (21). برای بدست آوردن مقدار نشت یون از رابطه زیر استفاده گردید:

$$EL = EC_1 / EC_2 \times 100$$

پراکسیداسیون لیپید غشاء: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، غلظت مالون‌دالدهید حاصل از این واکنش به روش هیس و پاکر (13) اندازه‌گیری شد (13). بر طبق این روش 0/2 گرم از بافت تازه گیاهی وزن شده و در هاون چینی حاوی 5 میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) 0/1 درصد سائیده شد.

انباری در جهت گسترش عمر نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها دارای اهمیت است. بدین منظور تکنیک‌های مختلفی شکل گرفته تا میزان سرمازدگی را کاهش دهند (1 و 23).

اکسید نیتریک یک رادیکال آزاد گازی شکل بسیار واکنش پذیر است که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است این ترکیب توسط گیاه تولید می‌شود و در غلظت‌های کم عمر انباری برخی از میوه‌ها، سبزی‌ها و گل‌های بریده را افزایش داده است (27). بر اساس گزارشات زو و همکاران (2006) در هلوهای تیمار شده با 5 و 10 میکرومول در لیتر اکسید نیتریک فعالیت آنزیم‌های آ - سی - سی اکسیداز¹، لیپوکسیژناز و میزان تولید اتیلن کاهش یافت. تیمار میوه‌های توت فرنگی با نیتریک اکسید با کاهش تولید اتیلن و کاهش سرعت تنفس پیری میوه‌ها را به تاخیر انداخته و از تغییر مواد جامد محلول و کاهش اسیدیته جلوگیری نمود (2). همچنین تیمار میوه کیوی با اکسید نیتریک سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و حفظ محتوای ویتامین ث و ای میوه شده و آسیب اکسایشی ناشی از اکسیژن‌های بازفعال شده را کاهش داده است (31). علاوه بر این‌ها اکسید نیتریک باعث کاهش علائم سرمازدگی در بسیاری از میوه‌ها از جمله هلو، انبه، آلو، ازگیل در طول انبار داری می‌شود (۳۲،۳۰،۲۹،۲۵). براساس گزارش ویو و همکاران (28) کاربرد اکسید نیتریک در غلظت 60 میلی مول بر لیتر بیشترین اثر را در کاهش آسیب سرمازدگی میوه‌های موز داشته است، همچنین با کاربرد تیمار مذکور میزان نشت یونی و میزان مالونیل دی آلدهید کاهش یافت.

در پژوهش حاضر به بررسی اثر اکسید نیتریک بر خواص بیوشیمیایی و کیفی میوه پرتقال واشنگتن ناول در طی دوره انبارداری پرداخته شد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر اکسید نیتریک بر کاهش سرمازدگی، نشت یون، پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش میزان پراکسید هیدروژن همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی تغییرات کیفی و بیوشیمیایی این محصول طی دوره انبارداری بوده است.

مواد و روش‌ها

میوه‌های پرتقال رقم واشنگتن ناول که روی پایه نارنج پیوند زده شده بودند و 20 سال سن داشتند، از اطراف درخت بطور تصادفی از یک باغ تجاری واقع در جنوب استان کرمان، شهرستان جیرفت در نیمه اسفند سال 1392 زمانی که میزان مواد جامد محلول کل آن‌ها به 7 تا 10 درصد رسید (با کمک دستگاه رفراکتومتر دستی میزان کل مواد جامد محلول بررسی شد)، برداشت شدند (7) و سپس میوه‌ها به سرعت به آزمایشگاه فیزیولوژی پس از برداشت گروه مهندسی علوم

عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ مدل NAPco2028R به مدت 10 دقیقه در 10000g سانتریفیوژ شد، به یک میلی لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، 4 میلی لیتر محلول 20 TCA در صد که حاوی 0/5 درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط حاصل به مدت 10 دقیقه در 10000 سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 532 نانومتر خوانده شد، ماده مورد نظر در این طول موج، کمپلکس قرمز رنگ (MDA-TBA) است، برای حذف ترکیبات اضافی، جذب نمونه ها در طول موج 600 نانومتر خوانده و از جذب نمونه در طول موج 532 نانومتر کسر گردید و برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل 155 میلی مولار بر سانتیمتر و معادله زیر استفاده گردید.

$$A = \epsilon \times B \times C$$

که در این معادله، A جذب خوانده شده، ϵ ضریب خاموشی، B، عرض کووت و C غلظت کمپلکس بر حسب میلی مولار است. پراکسید هیدروژن: برای سنجش پراکسید هیدروژن 0/1 گرم از بافت گیاهی را با 3 میلی لیتر تری کلرواستیک اسید در حمام یخ مخلوط استفاده شد و سپس هر نمونه در طول موج 390 نانومتر خوانده شد (26).

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی برای اندازه گیری فعالیت

آنزیم ها عصاره پروتئین بدینگونه تهیه شد که یک گرم بافت گیاهی در هاون حاوی 5 میلی لیتر بافر تریس هیدروژن کلرید 0/05 مولار با pH=7/5 سائیده شد تا محلول همگنی به دست آید. بعد از انتقال به لوله سانتریفیوژ، به مدت 25 دقیقه در 10000 دور و در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند، سپس لوله ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی را در لوله آزمایش ریخته و عصاره پروتئینی حاصل شد که برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت (5).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

2 میلی لیتر بافر تریس 100 میلی مولار (pH=7/5)، 300 میکرولیتر آب اکسیژنه 5 میلی مولار و 200 میکرولیتر پیروگالل 10 میلی مولار که همگی آن ها را در حمام یخ با هم مخلوط نموده و منحنی تغییرات جذب در طول موج 425 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (15).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت کاتالاز براساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج 240 نانومتر صورت گرفت (9). میزان فعالیت آنزیم بر اساس غلظت آب اکسیژنه تجزیه شده، محاسبه شد، لذا غلظت آب

اکسیژنه مصرف شده با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید.

اسیدهای آلی: برای اندازه گیری اسیدهای قابل تیتراسیون، 10

میلی لیتر از عصاره میوه با 20 تا 40 میلی لیتر آب مقطر اضافه و سپس به محلول فوق چند قطره فنول فتالین یک درصد اضافه گردید. در نهایت عمل سنجش حجمی (تیتراسیون) توسط هیدروکسید سدیم 0/1 نرمال تا رسیدن به pH=7 انجام شد (6).

اسیدیته: جهت تعیین اسیدیته آب میوه از عصاره صاف شده

میوه و با استفاده از دستگاه pH متر در دمای 20 درجه سانتی گراد اندازه گیری انجام گرفت.

اسید آسکوربیک: برای اندازه گیری اسید آسکوربیک، 1/269

گرم ید را با 16/6 گرم یدیدپتاسیم در آب مقطر مخلوط کرده و حجم آن به یک لیتر رسانده شد. سپس 20 میلی لیتر از مخلوط فوق را در یک ظرف دیگر ریخته، این مخلوط را با محلول اسید آسکوربیک خالص تیتر شد. برای محاسبه فاکتور مخلوط ید از معادله زیر استفاده شد (6).

$$F = \frac{A}{B \times N \times 88.1}$$

F- فاکتور مخلوط ید، A- مقدار اسید آسکوربیک خالص (میلی گرم)، B- مقدار مخلوط ید مصرف شده (میلی گرم)، N- نرمالیه مخلوط ید

بعد از تعیین فاکتور ید، 10 میلی لیتر از عصاره میوه را در یک ظرف ریخته و به آن 2 میلی لیتر نشاسته 1 درصد اضافه می شود. سرانجام با استفاده از فرمول زیر مقدار اسید آسکوربیک در عصاره میوه محاسبه می شود:

$$A = \frac{S \times N \times F \times 88.1}{10} \times 100$$

A- مقدار اسید اسکوربیک در عصاره میوه (میلی گرم در 100 میلی لیتر)، S- مقدار محلول ید مصرف شده (میلی لیتر)

مواد جامد محلول کل: در این تحقیق اندازه گیری مواد جامد

محلول توسط رفاکتومتر دستی (مدل MT-098P8A)، صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی

با 3 تیمار و در 3 تکرار انجام گرفت. در هر تکرار و در هر زمان، 10 عدد میوه استفاده شد. تجزیه آماری و مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن به کمک نرم افزار SAS (Ver. 9.1) انجام گرفت و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده گردید.

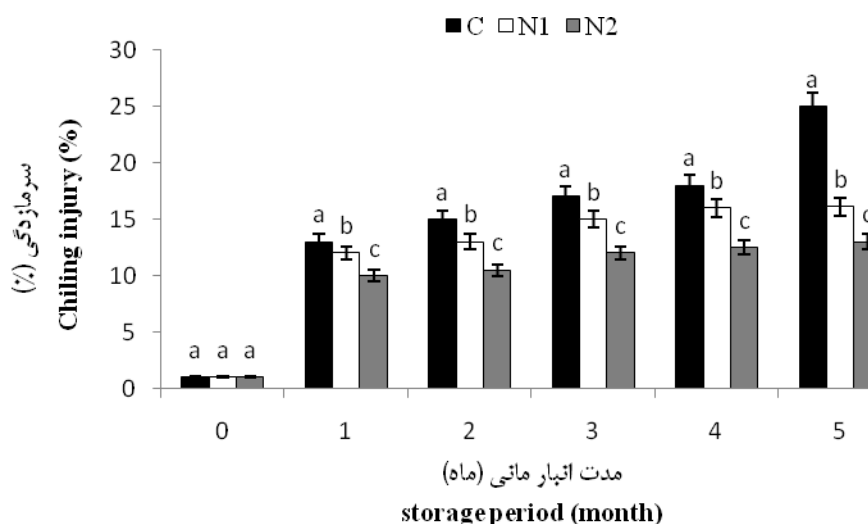
نتایج و بحث

خسارت سرمازدگی و نشت یون: طبق نتایج بدست آمده،

قهوه ای شدن پوست میوه ها و نشت یون طی انبارداری افزایش یافت و تیمار اکسید نیتریک به طور معنی داری خسارت سرمازدگی و نشت

می شوند (3). زو و همکارانش (31) گزارش کردند که اکسید نیتریک مانع سنتز اتیلن در گیاه توت فرنگی در طول مدت نگهداری در انبار می گردد و عمر انبارمانی را با کاهش فرایند رسیدن و افزایش مقاومت به دمای پایین افزایش دهد (16) که این یافته ها نتایج حاصل از این پژوهش را تایید می نمایند. طبق نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، تیمار اکسید نیتریک با مکانیسم هایی که در مورد آن شرح داده شد، آسیب سرمازدگی را در میوه های پرتقال طی انبار مانی کاهش داده است.

یون را کاهش داد (شکل 1 و 2 و 3 کاهش خسارت سرمازدگی با غلظت های تیمار شده اکسید نیتریک رابطه داشته و کمترین میزان آسیب میوه مربوط به بالاترین غلظت اکسید نیتریک بود و با شاهد تفاوت معنی داری داشت. بر اساس تحقیقات انجام شده روی فرآورده های برداشته شده باغبانی، آسیب سرمازدگی همراه با نشت یون و پراکسیداسیون لیپیدها می باشد. طی تنش سرما، آسیب هایی به سلول وارد می شود که به صورت ناهنجاری هایی روی سطح گیاه یا فرآورده، مشخص می گردند که این نابسامانی های ظاهری به دلیل افزایش اکسیدان هایی مانند پر اکسید هیدروژن و نشت یون ایجاد



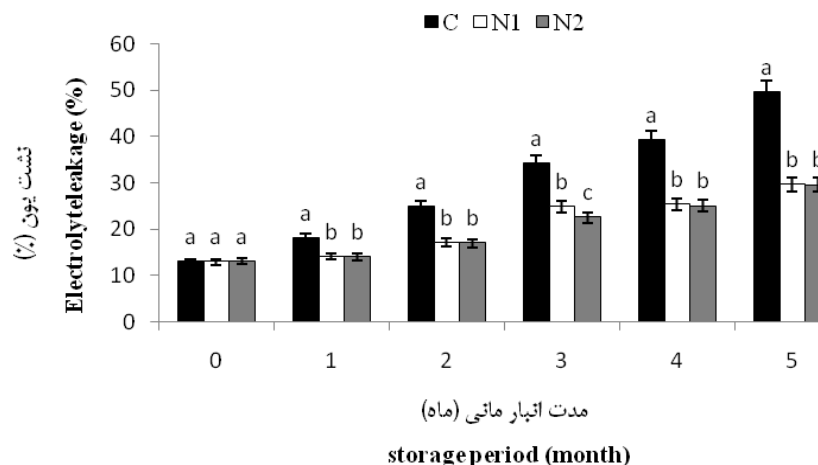
شکل 1- اثر تیمار اکسید نیتریک روی خسارت سرمازدگی (درصد) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبار مانی. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 1- Effect of nitric oxide treatment on chilling injury (%) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).



شکل 2- اثر تیمار اکسید نیتریک روی خسارت سرمازدگی (درصد) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبار مانی.

Figure 2- Effect of nitric oxide treatment on chilling injury (%) of Washington Navel orange fruit during storage

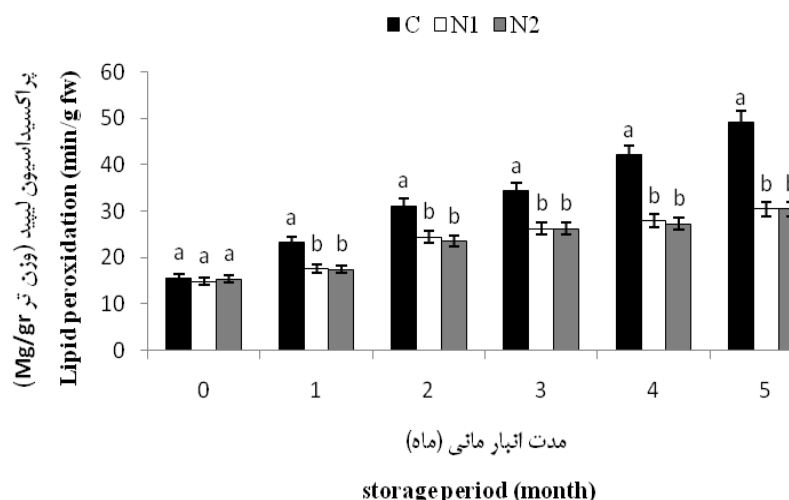


شکل 3- اثر تیمار اکسید نیتریک روی نشت یون (درصد) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبار مانی. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 3- Effect of nitric oxide treatment on electrolyte leakage (%) of Washington Navel orange fruit during storage C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

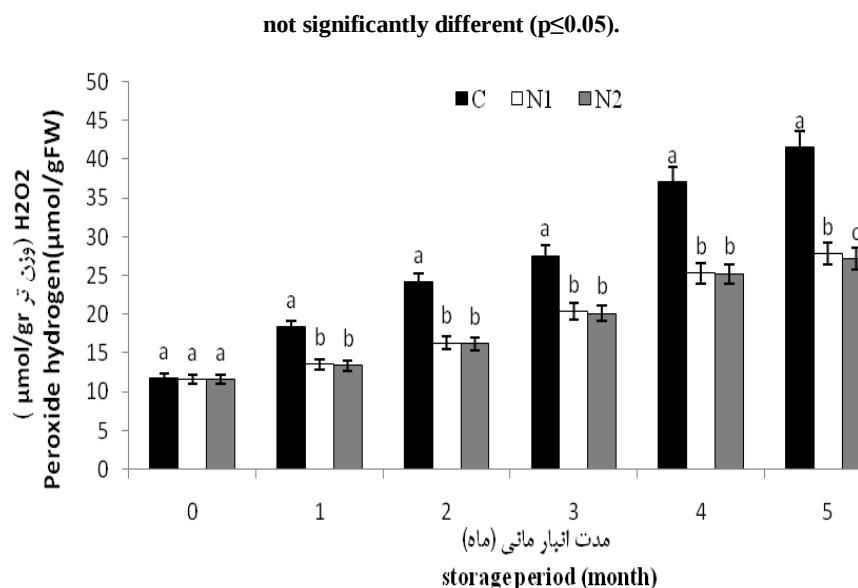
پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و میزان پراکسید هیدروژن: طی انبارداری میوه پرتقال واشنگتن ناول میزان پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن کمتر را نشان دادند.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و میزان پراکسید هیدروژن: طی انبارداری میوه پرتقال واشنگتن ناول میزان پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن در میوه های تیمار شده و شاهد روند افزایشی داشت و بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپیدها و



شکل 4- اثر تیمار اکسید نیتریک بر پراکسیداسیون لیپید (Mg/gFW) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبارداری. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 4- Effect of nitric oxide treatment on lipid peroxidation (Mg/gFW) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).



شکل 5- اثر تیمار اکسید نیتریک بر پراکسید هیدروژن ($\mu\text{mol/gFW}$) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبارداری. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 5- Effect of nitric oxide treatment on hydrogen peroxide ($\mu\text{mol/gFW}$) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی طی انواع تنش بخصوص تنش سرما افزایش می یابد (19) زیرا آنزیم های آنتی اکسیدانی با خاصیت آنتی-اکسیدانی خود، باعث حذف رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن شده و از تخریب غشاء سلول، نشت یون و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به طور معنی دار جلوگیری می نمایند. بنابراین، این یافته ها نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر را تأیید می نمایند.

مواد جامد محلول: طی 5 ماه انبارمانی، مواد جامد محلول در میوه های تیمار شده و نشده، افزایش یافت، بطوریکه تیمار 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک بیشترین و شاهد کمترین درصد میزان مواد جامد محلول را طی انبارمانی دارا بودند (شکل 7). میزان مواد جامد محلول، یکی از عوامل مهم در کیفیت میوه پرتقال می باشند و کاهش این مواد از کیفیت و بازارپسندی محصول می کاهد. تا کنون گزارشی مبنی بر اثر نیتریک اکسید روی ویژگی های کیفی و بیوشیمیایی میوه ها ارائه نشده است و این در حالی است که نتایج برخی از پژوهش ها حاکی از آن است که کاربرد ترکیبات شیمیایی روی میوه ها طی انبارمانی باعث افزایش ویژگی های کیفی میوه ها می گردند، زیرا این ترکیبات، روند تغییرات مواد جامد محلول را به دلیل کند شدن فرآیند رسیدن میوه و کاهش تنفس تعدیل می نمایند (14) و احتمالاً تیمار اکسید نیتریک، با تاثیری که روی کند شدن روند رسیدن و کاهش سرعت تنفس سلول های فرآورده طی انبارمانی، از مواد جامد محلول محافظت می نماید، به طوری که طبق نتایج بدست آمده از تحقیق

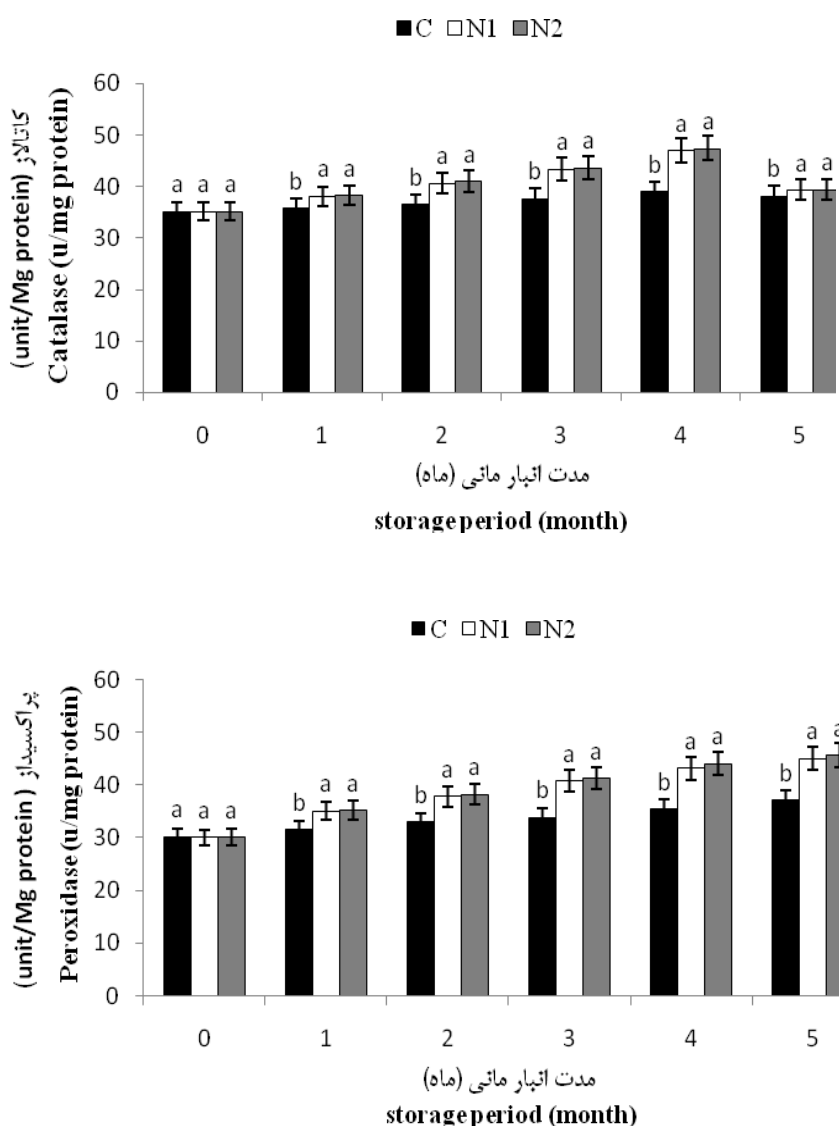
میوه های تیمار شده با 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک کمترین پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن را نشان دادند که در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی داری وجود (شکل 4 و 5). افزایش در نشت کلی یون ها بخصوص پتاسیم باعث ایجاد حساسیت های سرمایی در بافت کالوس گریپ فروت (11) و در مرکبات شده است (24). انبارداری در دمای کم به طور کلی، برای کاهش زوال در میوه های مرکبات استفاده شده است، اما میوه های مرکبات حساس به سرما شده و ممکن است توسط دمای پایین خسارت ببینند (20). یانگ و همکاران (18) گزارش نمودند، کاربرد اکسید نیتریک با غلظت 25 میکرو مولار روی میوه خیار، عمر انبار مانی را افزایش داد، زیرا این ماده با فعال کردن مکانسیم های آنتی اکسیدانی، نظیر آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، گونه های فعال اکسیژن و رادیکال های آزاد را از بین می برند و بدین ترتیب عمر انبار مانی را با کاهش آسیب سرمازدگی به حداقل می رسانند، که نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، با پژوهش های انجام شده روی خیار مطابقت دارد.

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی: طبق نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در میوه های شاهد و تیمار شده طی انبارداری افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در میوه های تیمار شده با اکسید نیتریک بخصوص غلظت بالاتر نیتریک اکسید (0/5 میلی مولار) و کمترین میزان در میوه های شاهد دیده شد (شکل 6). طبق تحقیقات انجام شده،

9) و روند کاهشی اسیدهای آلی میوه (شکل 10) در تمامی میوه‌های تیمار شده و شاهد در طی دوره انبارمانی مشاهده شد، بطوریکه بیشترین میزان pH و اسید اسکوربیک در انتهای دوره انبارداری در تیمار اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار مشاهده گردید و روند این تغییرات در میوه‌های تیمار شده کمتر از شاهد بود.

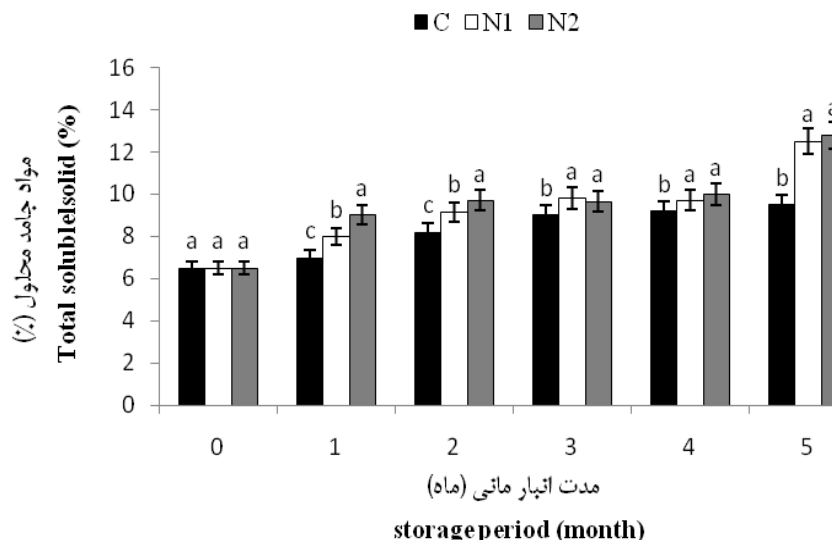
حاضر تیمار میوه‌های پرتقال با اکسید نیتریک نسبت به تیمار شاهد روند تغییرات مواد جامد محلول را کمتر کاهش داده است، که با پژوهش‌های پیشین مبنی بر اثر اکسید نیتریک در تاخیر در رسیدگی و افزایش کیفیت فرآورده‌ها طی انبارمانی مطابقت دارد (4).

اسید آسکوربیک، اسید قابل تیتراسیون و pH: طبق پژوهش حاضر، سیر افزایشی در میزان اسکوربیک و pH (شکل 8 و



شکل 6- اثر تیمار اکسید نیتریک بر میزان فعالیت کاتالاز و آنزیم پراکسیداز (U/mg protein) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبارداری. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 6- Effect of nitric oxide treatment on catalase and peroxidase (U/mg protein) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).



شکل 7- اثر تیمار اکسید نیتریک بر مواد جامد محلول (درصد) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبارداری. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 7- Effect of nitric oxide treatment on total soluble solids (%) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

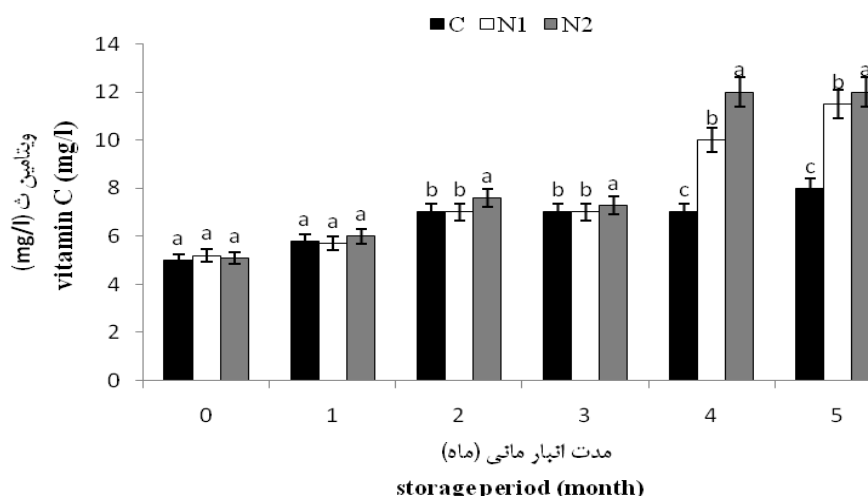
آلی متابولیت های ثانویه ای هستند که در نتیجه چرخه اسید سیتریک بوجود آمده و در طی تنفس مصرف می شوند، بنابراین طی انبار مانی، میزان اسیدهای آلی کاهش و اسیدیته افزایش می یابد و تیمار اکسید نیتریک پیری را به تاخیر می اندازد این امر را لشم و همکاران در سال (16) مشاهده کرد که میزان اکسید نیتریک در میوه های رسیده و گلهای پیر کمتر از میوه های کال و گلهای جوان و شاداب است و بنابراین نتیجه گیری کرد کاهش تولید اکسید نیتریک با پیری و بلوغ ارتباط دارد (17). برای اثبات چنین فرضیه ای او و همکارانش از اکسید نیتریک خارجی در گلهای میوه ها و سبزیجات استفاده کردند و مشاهده نمودند که در تمام موارد، اکسید نیتریک طول عمر محصولات را پس از برداشت افزایش داده و پیری را به تاخیر می اندازد و کیفیت فرآورده را نیز طی انبار مانی بهبود می بخشد، که این یافته ها، نتایج حاصل از این تحقیق را تایید می نمایند (19).

نتیجه گیری

حساسیت به دمای پایین باعث محدود کردن عمر انبارداری و کاهش کیفیت میوه ها می شود. تغییر در واکنش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مختلف در داخل میوه به همراه وقوع نابسامانی های ظاهری از عوامل کاهش بازارپسندی در میوه ها در دمای پایین و در طول انبارداری می باشند. اخیراً استفاده از موادی مانند اکسید نیتریک به منظور افزایش عمر انبارداری میوه ها مورد توجه قرار گرفته است.

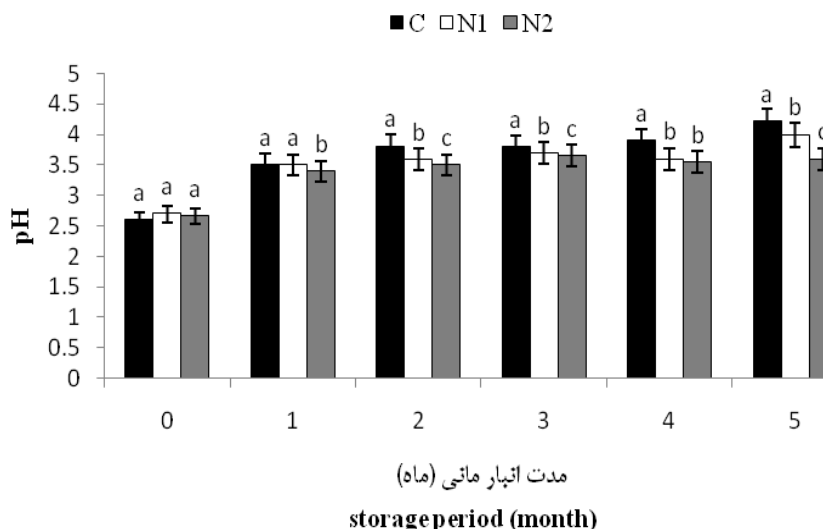
اسید اسکوربیک از جمله آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی می باشد که در شرایط تنش در سلول های زنده سنتز می شود (17). بوردلرو و همکاران (2006) نیز گزارش کردند، کاهش برخی از مواد غذایی مانند اسید اسکوربیک یک فاکتور بحرانی در عمر انبارمانی در بعضی محصولات مانند آب میوه مرکبات است (6). از آنجایی که نقش اکسید نیتریک در افزایش مقاومت سلول های زنده در انواع تنش ها به دلیل افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آنهاست، بنابراین افزایش در میزان اسید اسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدان غیر آنزیمی در میوه های تیمار شده، فرایندی طبیعی است و نتایج حاصل از این پژوهش را تایید می نماید (18).

روند تغییرات اسیدهای آلی در این تحقیق حاکی از کاهش مقدار این اسیدها در طی دوره انبارمانی بود. به گونه ای که در کلیه تیمارها و شاهد با افزایش طول دوره انبار مانی، مقدار اسیدهای آلی نیز کاهش پیدا نمود. مقایسه بین تیمارها در زمان های مختلف نمونه برداری مشخص کرد، در بین تیمارهای به کار رفته، بیشترین مقدار اسیدهای آلی در طول دوره انبار مانی، متعلق به تیمار 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک بوده است. نتایج حاصل از اندازه گیری pH نشان داد، پرتقال های مورد تیمار با اکسید نیتریک، عکس روند تغییرات اسیدهای آلی بوده است. اسید سیتریک بعنوان اسید غالب در میوه های پرتقال می باشد (8). طعم و مزه در نتیجه حضور قندها و اسیدهای آلی در میوه پرتقال می باشد، از آنجاکه بیشتر اسیدهای



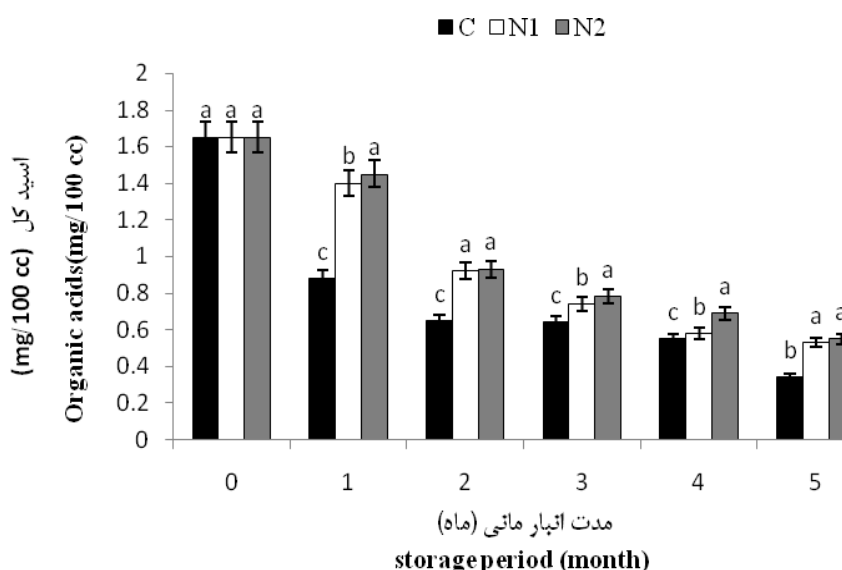
شکل 8- اثر تیمار اکسید نیتریک روی میزان اسید آسکوربیک (ویتامین ث) (mg/100ml) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبار مانی. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 8- Effect of nitric oxide treatment on ascorbic acid (vitamin C) content (mg/100 ml) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).



شکل 9- اثر تیمار اکسید نیتریک روی pH میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبار مانی. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 9 - Effect of nitric oxide treatment on pH of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).



شکل 10- اثر تیمار اکسید نیتریک روی اسید قابل تیتراسیون (g/100ml) میوه پرتقال واشنگتن ناول طی انبار مانی. C: شاهد، N1: اکسید نیتریک 0/25 میلی مولار و N2: اکسید نیتریک 0/5 میلی مولار. در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسانی هستند، در سطح 5 درصد آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Figure 10 - Effect of nitric oxide treatment on titratable acidity (g/100 ml) of Washington Navel orange fruit during storage. C: control fruit; N1: nitric oxide 0.25 mM; N2: nitric oxide 0.5 mM. For each column means followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$).

داد که اکسید نیتریک نقش مهمی در بهبود ویژگی های کیفی و بیوشیمیایی فرآورده های باغبانی طی انبارداری دارند. تیمار اعمال شده، خسارت سرمازدگی محصول مرکبات را به شدت تحت تأثیر قرار داده و کاهش می دهد، بنابراین بهبود انبارداری مرکبات بخصوص پرتقال نقش مهمی در سود اقتصادی باغداران دارد، بنابراین طبق نتایج حاصل از پژوهش حاضر، استفاده از تیمار اکسید نیتریک خسارت سرمازدگی، نشت یون، پراکسیداسیون لیپیدها را طی انبارداری میوه پرتقال کاهش داده است و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را افزایش داده است. به نظر می رسد که استفاده از تیمارهای اکسید نیتریک بخصوص غلظت 0/5 میلی مولار آن می تواند نقش مهمی در کاهش خسارت سرمازدگی و بهبود خصوصیات بیوشیمیایی میوه طی انبارداری ایفاء نماید و جهت افزایش عمر انبارداری فرآورده های باغبانی توصیه می گردد.

طبق تحقیق حاضر، کاربرد اکسید نیتریک نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری خسارت سرمازدگی، نشت یون، پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن را کاهش داد. همچنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی میوه های تیمار شده با اکسید نیتریک نسبت به شاهد، بسیار افزایش یافت. طبق نتایج حاصل از این پژوهش، میوه های تیمار شده با 0/5 میلی مولار اکسید نیتریک دارای بالاترین کیفیت و بیشترین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی با کمترین خسارت سرمازدگی بودند. تحقیقات نشان داده است که اکسید نیتریک، از تشکیل رادیکال های فعال اکسیژن که باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و نشت یون می شوند، جلوگیری می نمایند و به دنبال این تغییر کاهش خسارت سرمازدگی نیز کاهش می یابد. در تنش سرمازدگی، مرگ سلول بر اثر افزایش رادیکال آزاد افزایش می یابد و علاوه بر نقش اکسید نیتریک در کاهش ناهنجاری های انباری، شواهد نشان

منابع

- 1- Aghdam M.S., and Bodbodak S. 2013. Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments. *Scientia Horticulturae*. 156: 73-85.
- 2-Asghari M.R., and Abdollahi R. 2012. Changes in quality of strawberries during cold storage in response to postharvest nitric oxide and putrescine treatments. *Acta Alimentaria* 12:1-13.
- 3-Basiouny F.M. 1996. Blueberry fruit quality and storability influenced by postharvest application of polyamines and heat treatments. *Proceeding Fland State Horticultural Society*, 109, 269-272.
- 4-Beligni M.V., and Lamatina L. 1999. Nitric oxide counteract cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species

- in plant tissues. *Planta* 208: 337-344.
- 5-Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248- 254.
 - 6-Burdurlu H.S., Nuray K., and Feryal K. 2006. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, 74, 211-216.
 - 7-Chang K. 1992. The evaluation of citrus demand and supply. *Proceeding of International Society Citric, Italy*. 3: 1153-1155.
 - 8-Cioroi M. 2007. Study on L-ascorbic acid contents from exotic fruits. *Cercetari Agronomici Moldova*. 1: 23-27.
 - 9-Dhindsa R.S., Dhindsa P., and Thorpe A.T. 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal Experimental Botany*, 32, 93-101.
 - 10-FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations Website. in: [http:// www.faostat.org](http://www.faostat.org).
 - 11-Forney C.F., and Peterson S.J. 1990. Chilling induced potassium leakage of cultured Citrus cells. *Physiologia Plantarum*, 78, 193-196.
 - 12-Fotouhi-Ghazvini R., and Fattahi-Moghadam J. 2006. Citrus Growth in Iran. University of Guilan. Rasht. Iran. 305p. (in Persian with English abstract)
 - 13-Heath R.L., and Packer L. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
 - 14-Kelebek H., Selli S., Canbas A., and Cabaroğlu T. 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic composition and antioxidant capacity of orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*. 91: 187-192.
 - 15-Kochba J., Lavee S., and Spiegel-Roy P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant and Cell Physiology*, 18, 463-497.
 - 16-Leshem Y.Y., and Haramaty E. 1996. Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulator*. 18: 155-159.
 - 17-Leshem Y.Y., and Haramaty E. 1998. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* foliage. *Journal of Plant Physiology*. 148: 258-263.
 - 18-Nilpraphruk P., Authanithe F., and Keebjan P. 2008. Effect of exogenous methyljasmonate on chilling injury and quality of pineapple. *Silpakorn University Science and Technology*. 2: 33-42.
 - 19-Pantastico E.B., Soule J., and Grierson W. 1968. Chilling injury in tropical and subtropical fruits: II. limes and grapefruit. *Proceeding of Tropical Region American Society. Horticultural Science*, 12, 171-183.
 - 20-Purvis A.C. 1985. Relationship between chilling injury of grape fruit and moisture loss during storage. Amelioration by polyethylene shrink film. *Journal of American Society Horticultural Science*, 110, 385-388.
 - 21-Sairam R.K., Deshmukh P.S., and Shukla, D.S. 1997. Tolerance to drought and temperature stress is relation to increased antioxidant enzyme activity in Wheat. *Journal of Agronomy Crop Science*, 178, 171-177.
 - 22-Schirra M., and D'hallewin G. 1997. Storage performance of "Fortune" mandarins following hot water dips. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 229-238.
 - 23-Schirra M., Mulas M., Fadda A., Mignani I., and Lurie S. 2005. Chemical and quality traits of 'Olinda' and 'Campbell' oranges after heat treatment at 44 or 46°C for fruit fly disinfestations. *Lebenson. Wiss. Technology*. 38: 519-527.
 - 24-Shahbaz M., and Ashraf M. 2007. Influence of exogenous application of nitric oxide on growth and mineral nutrients of wheat under saline conditions. *Plant Physiology*, 143, 513-522.
 - 25-Singh S.P., Singh Z., and Swinny E.E. 2009. Postharvest nitric oxide fumigation delay fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* L.). *Postharvest Biology and Technology*. 53: 101-108.
 - 26-Velikova V., Yordanov I., and Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66.
 - 27-Wills R.B.H., and Bowyer M.C. 2000. Use of nitric oxide to extend the postharvest life of horticultural produce. *Acta Horticulturae*. 217: 141-147.
 - 28-Wu B., Guo Q., Li Q., and Ha Y. 2014. Impact of postharvest nitric oxide treatment on antioxidant enzymes and related genes in banana fruit in response to chilling tolerance. *Postharvest Biology and Technology*. 92: 157-163.
 - 29-Xu M., Dong J., Zhang M., Xu X., and Sun L. 2012. Cold-induced endogenous nitric oxide Generation plays a role in chilling tolerance of loquat fruit during postharvest Storage. *Postharvest Biology and Technology*. 65: 5-12.
 - 30-Zaharah S.S., and Singh Z. 2011. Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored 'Kensington Pride' mango. *Postharvest Biology and Technology*. 60: 202-210.
 - 31-Zhu S., Sun L., Liu M., and Zhou J. 2008. Effect of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in kiwifruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 2324-2331.
 - 32-Zhu L. Q., Zhou J., and Zhu S.H. 2010. Effect of a combination of nitric oxide treatment and intermittent warming on prevention of chilling injury of 'Feicheng' peach fruit during storage. *Food Chemistry*. 121: 165-170.



Effect of Nitric Oxide Application on Reduction of Undesirable Effects of Chilling on Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L.) Fruit during Storage

B. Ghorbani^{1*} - Z. Pakkish²

Received: 01-08-2015

Accepted: 21-02-2017

Introduction: Chilling injury (CI) is the primary postharvest problem of orange (*Citrus sinensis* L.) and many other horticultural crops during storage. Washington Navel orange fruits are susceptible to CI during storage below 5°C, and the main CI symptoms are surface pitting, browning, discoloration and decay. Several promising methods have been developed to alleviate CI symptoms of orange fruit. These include postharvest physical treatments with UV-C, modified atmosphere packaging, temperature conditioning, and chemical treatments with plant growth regulators. Oxidative stress from excessive reactive oxygen species (ROS) has been associated with appearance of chilling damage in fruits. The oxidation of ROS is due to their reaction with numerous cell components coursing a cascade of oxidative reactions and consequent inactivation of enzymes, lipid peroxidation, protein degradation, and DNA damage. Aerobic organisms have evolved well-developed defense systems to establish a fine-tuned balance between ROS production and removal plants are protected against ROS effects by a complex antioxidant system. This involved both lipid soluble antioxidant (α -tocopherol and carotenoids) and water soluble reductants (glutathione and ascorbate) and enzymes, such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD). Previous studies have shown that there is a positive relationship between the antioxidant enzymes activity and the chilling tolerance in harvested fruits. Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule involved in many plant physiological processes. It has also been indicated that NO protects plant cells against oxidative stress by reducing ROS accumulation. When exogenously applied, NO has been shown to result in an improved chilling tolerance and reduced incidence of chilling injury in several fruits. The objectives of this study were to evaluate the effects of NO on chilling injury, lipid peroxidation content, peroxide hydrogen content, and the induction of antioxidant enzymes in Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L.) fruit during storage at 5±1°C.

Materials and Methods: Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L.) fruits were harvested at commercial maturity from a commercial orchard in Kerman, Iran, and transported to the laboratory on the same day. Orange fruits were treated with 0.25 and 0.5 mM nitric oxide for 5 min and then stored at 5±1°C and relative humidity of 85-90 % for 5 months. No nitric oxide use was considered as control. The experiment was arranged in completely randomized design (CRD) with three replicates. Characteristics such as chilling injury, total soluble solids, titratable acidity, pH, ascorbic acid, and activity of antioxidant enzymes (peroxidase and catalase) were evaluated in the present experiment.

Results and Discussion: The results showed that use of nitric oxide in fruits reduced significantly chilling injury, ion leakage, lipid peroxidation and hydrogen peroxide compared to control, though it increased activity of antioxidant enzymes. According to these results, unlike organic acids which decreased in treated and non-treated fruits, total soluble solids, ascorbic acid and pH of the fruits increased during storage, however, nitric oxide treatment reduced the rate of changes, be either reducing or increasing, in the mentioned parameters compared to control. So, fruits treated with 0.5 mMol nitric oxide showed the highest effect on the reduction of chilling injury.

In the present study, the results indicated that NO significantly reduced CI of orange fruits during storage at 5±1 °C. NO has been applied to reduce the development of chilling injury symptoms in a number of horticultural crops. Thus NO has the potential of application in postharvest treatment by alleviating chilling injury and maintaining quality, and the aim of this study was to determine how NO alleviates the anti-oxidative systems, probably one of the mechanisms of improved chilling tolerance, of orange fruit during chilling stress. This indicates that the chilling tolerance of orange fruit was also enhanced by postharvest treatment with NO. Lipid peroxidation and protective enzyme systems are often evaluated in studies of plant mechanisms under various stresses. Low temperature disrupts the balance of active oxygen species metabolism, leading to their accumulation and destruction of scavenging enzymes such as catalase and peroxidase. In the present study,

1and 2- MSc. Student of Horticultural Science and Assistant Professor, Horticultural Research Institute, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

(*- Corresponding Author Email: ghorbani.bahareh@gmail.com)

exogenous per-treatment with nitric oxide at 0.25 and 0.5 mM significantly decreased the lipid peroxidation content and electrolyte leakage of cold stored orange fruit compared to untreated fruits. The level of H_2O_2 was maintained by NO treatment, which led to an increase in chilling tolerance. It has been reported that the improvement of chilling tolerance in harvested horticultural crops is related to the enhancement in activities of antioxidant enzyme. Researchers found that chilling-tolerant mandarins have a higher antioxidant enzyme activity than the chilling-sensitive ones. A number of postharvest treatments that induce chilling tolerance and alleviate chilling injury also enhanced antioxidant enzyme activity. However, to the best of our knowledge, this is the first paper reporting the beneficial effects of NO on CI of postharvest orange fruits. In this study, there was a continuous increase in peel and pulp lipid peroxidation content in all fruits, but the application of NO significantly delayed the increase of lipid peroxidation. Moreover, the change in membrane permeability (revealed by H_2O_2 content) showed trends similar to lipid peroxidation content; in other words, peel and pulp H_2O_2 content increased with storage duration, but NO markedly delayed the increase. NO has been considered to be involved in a network of interacting signal transduction pathways, which regulate defense responses to abiotic stress. The detoxification of ROS is dependent on antioxidant enzymes such as CAT and POD. The increase in these enzymes' activity contributes to the adaptation of plants to cold stress and ameliorates oxidative damage such as lipid peroxidation (lipid peroxidation increase as indicator) and H_2O_2 content.

Conclusion: In conclusion, application of NO reduced CI of oranges stored at $5\pm 1^\circ C$ and maintained oranges quality as well. The chilling injury, lipid peroxidation, and peroxide hydrogen were significantly reduced by NO treatment especially at 0.5 mM. Induced cold resistance by NO treatment may be due to the stimulation of antioxidant enzymes, and protection against membrane oxidative damage, decreased lipid peroxidation and H_2O_2 content in orange fruits. These results may have implications for the use of NO in managing postharvest CI of other subtropical fruits stored at low temperatures.

Keywords: Storage, Antioxidant enzyme, Orange, nitric oxide



مطالعه تأثیر کادمیم، روی و زئولیت بر خصوصیات فیزیومورفولوژیکی گل راعی (*Hypericum perforatum* L.)

ژاله زندوی فرد^{1*} - مجید عزیزی² - حسین آرویی³ - امیر فتوت⁴

تاریخ دریافت: 1394/06/09

تاریخ پذیرش: 1394/11/13

چکیده

در بین عناصر سنگین، کادمیم به دلیل تحرک و زیست فراهمی زیاد در خاک و ایجاد سمیت در غلظت‌های کم، اهمیت ویژه‌ای دارد. گل راعی، دومین گیاه پرمصرف در درمان افسردگی، به عنوان یک گیاه بیش‌اندوز کادمیم شناخته شده است. به دلیل ظرفیت تبادل کاتیونی بالای کانی زئولیت و شباهت رفتار شیمیایی یون‌های روی و کادمیم، افزایش زئولیت و روی در محیط رشد گیاه، می‌تواند تعدیل‌کننده‌ی اثرات سمی کادمیم باشد. بدین منظور، آزمایشی به صورت فاکتوریل سه عاملی بر پایه‌ی طرح بلوک‌های کامل تصادفی با 27 تیمار و سه تکرار، به صورت گلدانی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد طی سال‌های 1392-1393 اجرا گردید. تیمارها شامل سولفات کادمیم (0، 10، 20 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، سولفات روی (0، 25، 50 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و زئولیت معدنی (0، 5، 10 گرم در کیلوگرم خاک) بر خاک اعمال شدند. نتایج نشان داد که افزایش سطح کادمیم منجر به کاهش معنی‌دار صفات ارتفاع گیاه، طول ریشه، تعداد ساقه گل‌دهنده، تعداد گل، سطح برگ و میزان کلروفیل نسبی به ترتیب 6/28، 3/45، 2/04، 5/49، 0/82 و 15/71 درصد نسب به شاهد گردید و تنها، تعداد گره‌های سیاه در برگ را 4/23 درصد نسبت به شاهد افزایش داد. تیمار ترکیبی روی و کادمیم تنها در صفات ارتفاع گیاه و طول ریشه توانست به طور معنی‌داری اثرات کاهنده کادمیم را کاهش دهد. هم‌چنین اثر متقابل کادمیم و زئولیت تنها برای صفات طول ریشه و تعداد گل معنی‌دار شد. به طور کلی، کاربرد سولفات روی و زئولیت تا حدودی اثرات سوء کادمیم بر صفات اندازه‌گیری شده را تعدیل کرد.

واژه‌های کلیدی: بیش‌اندوز کادمیم، سولفات روی، سولفات کادمیم، کلینوپتیلولیت، گیاهان دارویی

مقدمه

خواص درمانی آن‌ها می‌باشد، را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (11).

برخی از گیاهان قادر به تجمع مقادیر زیادی از کادمیم (غلظت‌های 10 تا 100 برابر از آن‌چه گیاه تحمل می‌کند) در ریشه و اندام هوایی خود هستند که به عنوان بیش‌اندوز کادمیم شناخته می‌شوند (14و16). گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) متعلق به تیره Hypericaceae دارای ترکیبات فعال و مکانیسم‌های پیشرفته‌ای است که به واسطه‌ی آن‌ها قادر است در خاک‌های آلوده به کادمیم رشد کند. این گیاه با مقادیر نسبتاً بالای کادمیم (1/087 میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک شاخه) می‌تواند به‌عنوان تجمع‌کننده‌ی کادمیم طبقه‌بندی شود (23). این گیاه دارای ترکیبات فعال متعددی متعلق به گروه‌هایی چون نفتودیانترون‌ها، فلاونوئیدها، اسانس‌ها و فلوروگلوکوسینول‌ها با اثرات بیولوژیکی ضد افسردگی، ضد سوختگی،... ثابت شده است (4). ترکیبات فعال هیپریسین و پسودوهیپریسین با خواص ضدویروسی، ضد رتروویروسی و ضدسرطانی درون گره‌های پرسلولی سیاه رنگ که ساختمان ترشحی خاص این گیاه می‌باشند، تجمع می‌یابند (13).

در ارزیابی روش‌های اصلاح خاک آلوده به کادمیم، اقتصادی

کادمیم از سمی‌ترین عناصری است که به دلیل آلودگی‌های جوی، کاربرد آفت‌کش‌ها و استفاده‌ی درازمدت از کودهای فسفره با ناخالصی‌های کادمیمی و یا لجن فاضلاب‌ها، در زمین‌های کشاورزی گسترش وسیعی دارد (7). از آثار سمیت عنصر کادمیم بر روی اندام گیاهی می‌توان به قهوه‌ای شدن حاشیه برگ‌ها، سوختگی، قرمزی رگبرگ‌ها و دمبرگ‌ها، پیچیدگی برگ‌ها، کاهش تراکم، کاهش رشد ریشه و چوب پنبه‌ای شدن ساختمان آن، تداخل با جذب و انتقال عناصر غذایی، کاهش میزان کلروفیل و اختلال در فعالیت آنزیم‌های درگیر در فتوسنتز اشاره کرد. تنش کادمیم، علاوه بر کاهش رشد و نمو گیاه، مقدار و کیفیت ترکیبات مؤثره‌ی گیاهان دارویی که مشمول

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*) نویسنده مسئول: (Email: zh.zandavifard@yahoo.com)

4- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.41836

می‌گیرند (12). محمودآبادی و همکاران (21) اثر ژئولیت و کادمیم را بر رشد سویا بررسی کردند. نتایج نشان داد که کاربرد کادمیم به میزان زیادی، وزن خشک ریشه و شاخه را کاهش داد. در حالی که غلظت آن در بخش‌های مختلف گیاه افزایش یافت. در عین حال کاربرد 15 گرم ژئولیت در هر کیلوگرم خاک، کاهش قابل ملاحظه‌ای در بخش تبادل کادمیم ایجاد نمود. این پژوهش به منظور بررسی امکان استفاده از سولفات روی و ژئولیت جهت کاهش سمیت ناشی از کادمیم بر برخی شاخص‌های رشدی و بهبود عملکرد در گل‌راعی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت گلدانی در مزرعه‌ی تحقیقاتی گروه علوم باغبانی واقع در پردیس دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد طی سال‌های 1392-1393 اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل 3 عاملی بر پایه‌ی طرح بلوک‌های کامل تصادفی با 27 تیمار و 3 تکرار و جمعاً در 81 گلدان طراحی شد. تیمارها شامل سه سطح سولفات کادمیم (0، 10، 20 میلی گرم در کیلوگرم خاک)، سه سطح سولفات روی (0، 25، 50 میلی گرم در کیلوگرم خاک) و سه سطح ژئولیت معدنی (0، 5، 10 گرم در کیلوگرم خاک) در نظر گرفته شدند. ترکیبات سولفات روی ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) و سولفات کادمیم ($CdSO_4 \cdot 4H_2O$) از شرکت MERCK خریداری شد و ژئولیت کلینوپتیلولیت نیز از معادن استان سمنان تهیه گردید. به منظور آماده‌سازی خاک، ابتدا 18 کیلوگرم خاک شامل مخلوطی از لایه سطح‌الارض مزرعه، ماسه بادی شسته شده و خاک برگ به نسبت 1:1:2 توزین شد. سپس تیمارها به روش محلول‌پاشی و اختلاط به خاک اضافه گردیدند. جهت محلول‌پاشی سولفات کادمیم و سولفات روی، سطوح مختلف این ترکیبات را در 300 سی‌سی آب (به ازای هر 3 کیلوگرم خاک، 50 سی‌سی آب) کاملاً حل نموده و به روی سطح خاک اسپری و مخلوط کرده به‌طوری که تمامی سطح خاک را کاملاً پوشش دهد. بذور گل‌راعی رقم توپاز از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی جمع‌آوری گردید. جهت بهبود سرعت و درصد جوانه‌زنی، ابتدا بذور به مدت 24 ساعت در آب جاری مورد شستشو قرار گرفتند. سپس بذور با کمی ماسه بادی مخلوط و به صورت سطحی در گلدان‌ها در تاریخ 20 مهر 1392 کشت شدند. 10 روز پس از کاشت، بذور جوانه زدند. در ابتدا سرعت رشد گیاهچه‌ها بسیار کند و بطئی بود. پس از رشد گیاهچه‌ها تا ارتفاع یک سانتی‌متری، گیاهچه‌ها تنک شدند و تنها 10 عدد در هر گلدان نگهداری گردید. آبیاری بر حسب نیاز صورت گرفت. نمونه‌برداری از گیاهان و اندازه‌گیری صفات مورد نظر در مرحله‌ی گلدهی کامل صورت گرفت. نمونه برداری فقط از دو بوته‌ی وسط هر گلدان در

بودن و سازگاری با محیط زیست از جمله نکات مهم مورد توجه است. از جمله روش‌های اصلاح خاک، کاربرد تیمارهای کودی به منظور غیر پویا سازی و کاهش جذب و انتقال این فلزات می‌باشد. کادمیم و روی دارای آثار متقابل شدیدی نسبت به هم هستند. این دو یون دارای ساختارهای شیمیایی مشابه‌اند و بر سر مکان‌های تبادل در سطح ریشه با یکدیگر رقابت می‌کنند. همچنین آن‌ها دارای یک سیستم انتقال در غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه هستند (33). همچنین روی نقش بازدارندگی در انتقال کادمیم به قسمت هوایی گیاه را دارد (2). به‌طور کلی، واکنش کادمیم و روی به صورت آنتاگونیسم (18، 19 و 20) و یا سینرژیست (25، 27 و 29) گزارش گردیده است. آدیولوگلو (1) با کاربرد روی (Zn) در خاک آلوده به کادمیم مشاهده کرد که وزن خشک گندم نان، شبدر، جو و ذرت به طور معنی‌داری افزایش و غلظت کادمیم اندام هوایی در این گیاهان کاهش می‌یابد. یو و جیمز (34) گزارش کردند که در گیاه جو، مصرف 1 تا 50 میکرومول کادمیم در لیتر باعث کاهش غلظت روی (Zn) شد. این پژوهشگران همچنین دریافتند که تغییرات فیزیولوژیکی که بر اثر سمیت کادمیم به وجود آمده با تیمار 300 میکرومول روی (Zn) در لیتر کاهش یافت. کومروا و همکاران (17) اثر کادمیم و روی (Zn) را بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی بابونه بررسی کردند. روی (Zn) توانست اثر سوء کادمیم بر محتوای کلروفیل و وزن خشک بابونه را بهبود بخشد. بهتاش و همکاران (5) عنوان کردند که کاربرد روی (Zn) باعث افزایش شاخص کلروفیل چغندر لبویی شده است. در این راستا، به نظر می‌رسد کاربرد کودهای روی، به ویژه سولفات روی، بر کاهش اثرات زیان بار کادمیم بر گیاه مفید واقع شود (28).

یکی دیگر از روش‌های کنترل آلودگی استفاده از روش غیر پویاسازی شیمیایی فلزات سنگین است. این روش با کاهش حلالیت فلزات سنگین باعث کاهش غلظت آن‌ها در گیاه می‌شود. یک گروه از کانی‌ها که به طور گسترده‌ای جهت غیر فعال سازی فلزات سنگین در خاک‌ها استفاده می‌شود ژئولیت است. ژئولیت دسته‌ای از آلومینوسیلیکات‌های متخلخل با بار منفی است که کارایی آن‌ها وابسته به ظرفیت تبادل بالای کاتیونی و میزان منافذ ریز آن‌ها است (8). ساختمان ژئولیت از نظر بار الکتریکی خنثی خواهد بود. در ساختمان ژئولیت تعدادی از یون‌های سیلیس چهار ظرفیتی توسط آلومینیوم سه ظرفیتی جایگزین شده که ایجاد بار الکتریکی منفی نموده و در نتیجه کمبود یک بار مثبت به وجود می‌آید. این کمبود بار مثبت از طریق قرار گرفتن کاتیون‌های یک ظرفیتی یا دو ظرفیتی (عمدتاً Na^+ ، Ca^{2+} ، Mg^{2+} و K^+) متوازن می‌گردد (24). در بین ژئولیت‌های طبیعی، کلینوپتیلولیت مؤثرترین تبادل‌کننده و جاذب یون به منظور تثبیت و حذف فلزات سنگین محسوب می‌شود (26). هم‌چنین کلینوپتیلولیت، فراوان‌ترین نوع ژئولیت طبیعی است و از نظر فراوانی، ذخائر کلینوپتیلولیت در ایران در جایگاه دوم بعد از آهن قرار

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اثر کادمیم، روی و زئولیت بر صفات مورفولوژیکی گل راعی در جدول 1 ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که ارتفاع گیاه به طور معنی داری در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر اثر ساده‌ی کادمیم و روی (Zn) قرار گرفته است ولی تیمار زئولیت تأثیر معنی داری بر این صفت نشان نداد. این در حالی است که تنها، اثر متقابل روی و زئولیت در سطح احتمال یک درصد بر صفت ارتفاع گیاه اختلاف معنی داری ایجاد کرد. نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده‌ی تیمارها نشان می‌دهد که با افزایش سطح کادمیم، ارتفاع گیاه کاهش یافته به طوری که بیش‌ترین ارتفاع گیاه (62/74 سانتی‌متر) در سطح صفر کادمیم و کم‌ترین ارتفاع (56/46 سانتی‌متر) در بالاترین سطح کادمیم (Cd₂₀) مشاهده شد. بالاترین میزان ارتفاع (62/61 سانتی‌متر) در سطح متوسط روی (Zn₂₅) مشاهده گردید (جدول 2).

اوایل تیرماه 1393 انجام شد. روش نمونه برداری به صورتی بود که پس از خارج کردن کامل گیاه از گلدان، بخش‌های بالایی گیاه (به طول 20-30 سانتی‌متر) برداشت شدند. صفات مورفولوژیکی و رشدی از قبیل صفات ارتفاع گیاه، طول ریشه، تعداد ساقه گل‌دهنده، تعداد گل، سطح برگ، تعداد گرهک سیاه برگ و میزان کلروفیل نسبی اندازه‌گیری شدند. جهت شمارش تعداد گرهک‌های سیاه، از بخش‌های بالایی، میانی و پایینی هر بوته به طور مجزا سه برگ انتخاب گردید و تعداد گرهک‌های سیاه در زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد. به منظور اندازه‌گیری سطح برگ از دستگاه سطح برگ سنج مدل (Li-Cor-1300, USA) استفاده شد. میزان کلروفیل نسبی نیز با دستگاه کلروفیل متر SPAD با سه تکرار تعیین شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌ها با نرم افزار JMP8 صورت گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد انجام گرفت و نمودارهای مربوطه با نرم افزار اکسل ترسیم شد.

جدول 1- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی در گل راعی تحت تأثیر کادمیم، روی و زئولیت

Table 1- ANOVA of morphological traits in *Hypericum perforatum* as affected by Cd, Zn and Zeolite.

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean squares						
		ارتفاع گیاه Plant height(cm)	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ساقه گل دهنده/گیاه No. of flowering stem/Plant	تعداد گل/گیاه No. of flower/Plant	سطح برگ Leaf area (cm ²)	تعداد گرهک سیاه/برگ No. of black nodule/leaf	کلروفیل نسبی Relative chlorophyll content(SPAD)
بلوک Block	2	13.7 ^{ns}	2.52 [*]	1.44 ^{ns}	32.26 ^{ns}	5.90 [*]	0.46 ^{ns}	5.58 ^{ns}
کادمیم Cd	2	265.96 ^{**}	8.67 ^{**}	45.37 ^{**}	208.26 [*]	4.63 [*]	151.19 ^{**}	106.85 ^{**}
روی Zn	2	362.79 ^{**}	127.11 ^{**}	14.92 ^{**}	101.15 ^{**}	8.69 [*]	44.16 ^{ns}	9.71 ^{ns}
زئولیت Zeolite	2	21.06 ^{ns}	2.86 [*]	0.26 ^{ns}	5.48 ^{ns}	0.70 ^{ns}	5.97 ^{ns}	25.57 [*]
کادمیم×روی Cd×Zn	4	3.80 ^{ns}	9.61 ^{**}	2.01 ^{ns}	2.85 ^{ns}	0.30 ^{ns}	38.68 ^{ns}	2.91 ^{ns}
کادمیم×زئولیت Cd×Zeolite	4	27.42 ^{ns}	5.42 ^{**}	5.18 ^{ns}	154.35 ^{**}	0.64 ^{ns}	11.33 ^{ns}	3.71 ^{ns}
روی×زئولیت Zn×Zeolite	4	89.67 ^{**}	6.17 ^{**}	0.85 ^{ns}	11.35 ^{ns}	0.85 ^{ns}	13.01 ^{ns}	14.30 ^{ns}
کادمیم×روی×زئولیت Cd×Zn×Zeolite	8	13.65 ^{ns}	4.28 ^{**}	1.00 ^{ns}	33.11 ^{ns}	0.42 ^{ns}	10.42 ^{ns}	2.38 ^{ns}
خطا Error	52	13.61	0.75	2.23	29.81	0.42	17.81	6.44

* معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد. ** معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد. ns عدم معنی‌داری

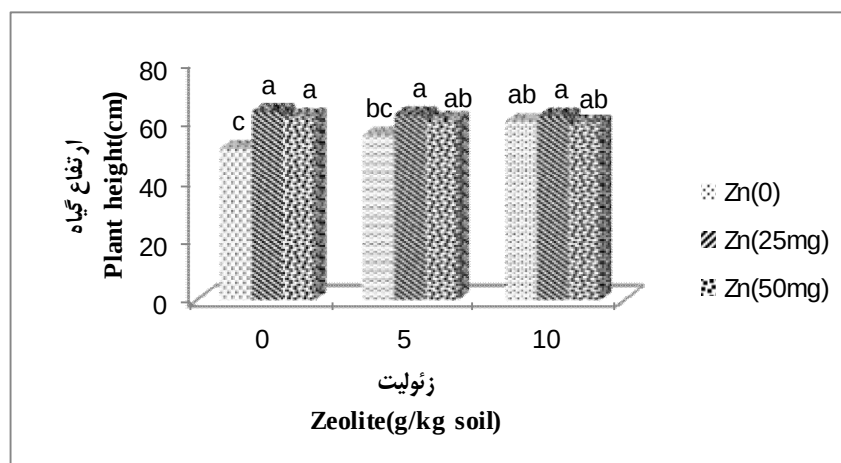
*, ** and ns are significant at $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and not significant, respectively

رشد گیاه می‌شود (36)، شارما و همکاران (30) نیز اعلام نمودند که کادمیم از طریق کاهش در رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش فتوسنتز

افزایش کادمیم در محیط رشد گیاه، جذب و توزیع عناصر ضروری از جمله آهن و منیزیم را کاهش می‌دهد و منجر به کاهش

بیشترین ارتفاع (61/85 سانتی‌متر)، مربوط به سطح متوسط روی (Zn₂₅) در غیاب زئولیت بود و کم‌ترین ارتفاع (51/01 سانتی‌متر) در سطح صفر زئولیت و روی حاصل شد (شکل 1). این نتایج با یافته‌های شوت و مکفی (31) بر گیاه سویا مطابقت داشت.

باعث کاهش رشد گیاهان می‌شود. مهار رشد توسط کادمیم می‌تواند به علت مهار تقسیم سلولی و سرعت طویل شدن سلول‌ها باشد که اغلب توسط مهار غیر قابل برگشت پمپ پروتون که مسئول این فرایند می‌باشد رخ می‌دهد. در برهم‌کنش روی (Zn) و زئولیت



شکل 1- مقایسه میانگین اثر متقابل روی و زئولیت بر ارتفاع گیاه گل راعی

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Figure 1- Mean comparison of the interaction effect of Zn and Zeolite on plant height of *Hypericum perforatum*. Means which followed by the same letter has no different significantly by the Tukey's test at 5% level of probability

مینزیم و عناصر کم مصرف مثل آهن، منگنز، مس و روی (Zn) جهت انتقال از طریق پروتئین‌های ناقل موجود در غشای سلولی رقابت می‌کند. کادمیم با کاهش طول و حجم ریشه از جذب دیگر عناصر ممانعت نموده و در نتیجه، جذب خود را بالاتر می‌برد. بنابراین با افزایش کادمیم در خاک و در نتیجه کاهش رشد ریشه، ریشه قادر نخواهد بود عناصر دیگر را به خوبی جذب کند. با افزایش روی (Zn) در خاک، رشد ریشه‌ی گیاهان افزایش یافته و انتقال مواد غذایی به نحو مطلوبی صورت می‌گیرد (32).

در اثر ترکیبی کادمیم و زئولیت، بالاترین مقدار طول ریشه (33/28 سانتی‌متر) در سطح صفر هر دو تیمار و کم‌ترین مقدار (28/44 سانتی‌متر) در سطوح Cd₂₀Zn₀ مشاهده گردید (شکل 3). هم‌چنین در مقایسه میانگین اثرات سه‌گانه در تیمار Zn₀Zn₅₀Cd₀ بیش‌ترین میانگین (36/26 سانتی‌متر) و در تیمار Zn₀Zn₀Cd₂₀ کم‌ترین مقدار (26/10 سانتی‌متر) حاصل شد (شکل 4). نتایج گویای اثر افزایش‌دهی کود روی بر طول ریشه و اثر کاهنده‌ی کادمیم بر این صفت می‌باشد. یافته‌های یانگ و همکاران (33)، در مورد گیاه *Sedum alfredi* این نتایج را تأیید کرد.

کادمیم و روی (Zn) در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری بر طول ریشه نهادند. هم‌چنین زئولیت نیز در سطح احتمال 5 درصد در افزایش طول ریشه تأثیرگذار بود (جدول 1). با افزایش سطوح کادمیم، طول ریشه کاهش یافته به‌طوری که بیش‌ترین طول ریشه (32/74 سانتی‌متر) در غیاب کادمیم و کم‌ترین مقدار آن (29/29 سانتی‌متر) در بالاترین سطح کادمیم مشاهده شد. مقایسه میانگین بین سطوح مختلف روی (Zn) نیز نشان داد که افزایش غلظت روی منجر به افزایش طول ریشه شده و در سطح Zn₅₀ با میانگین (33/20 سانتی‌متر) بیش‌ترین و سطح Zn₀ با میانگین (28/86 سانتی‌متر) کم‌ترین طول ریشه حاصل گردید. مقایسه میانگین مربوط به سطوح زئولیت نیز، گویای اثر مثبت این تیمار بر افزایش طول ریشه است که بیش‌ترین مقدار طول ریشه (31/34 سانتی‌متر) در بالاترین سطح Zn₁₀ و کم‌ترین مقدار (30/74 سانتی‌متر) در غیاب زئولیت به‌دست آمد (جدول 2).

بررسی اثر متقابل کادمیم و روی، بیش‌ترین طول ریشه (33/61 و 33/79 سانتی‌متر) را به ترتیب در سطوح کادمیم Cd₀ و Cd₁₀ در ترکیب با Zn₅₀ و کم‌ترین مقدار (26/74 سانتی‌متر) را در سطوح Cd₂₀Zn₀ نشان داد (شکل 2). مشخص شده است که کاهش طول ریشه تحت تنش کادمیم به دلیل اختلال در جذب عناصر غذایی و آب می‌باشد (9). کادمیم با عناصر پرمصرف نظیر فسفر، کلسیم و

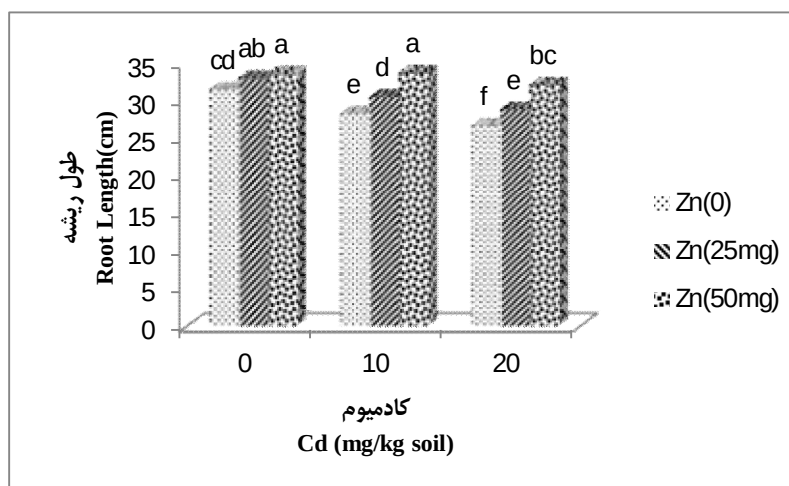
جدول 2- مقایسه میانگین اثرات ساده تیمارها برای صفات مورفولوژیکی در گل راعی

Table 2- Mean comparison of the single effect of treatments on morphological traits in *Hypericum perforatum*

تیمار Treatment	ارتفاع گیاه Plant height(cm)	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ساقه گل دهنده گیاه No. of flowering stem/Plant	تعداد گل گیاه No. of flower/Plant	سطح برگ Leaf area (Cm ²)	تعداد گرهک سیاه/برگ No. of black nodule/leaf	کلروفیل نسبی Relative chlorophyll content (SPAD)
کادمیم Cd							
0	62.74 ^a	32.74 ^a	9.48 ^a	38.74 ^a	3.80 ^a	13.29 ^b	99.31 ^a
10	59.75 ^b	30.89 ^b	7.07 ^b	35.22 ^b	3.27 ^b	13.55 ^b	13.29 ^b
20	56.46 ^c	29.29 ^c	7.44 ^b	33.25 ^b	2.98 ^b	17.52 ^a	16.28 ^b
روی Zn							
0	55.55 ^b	28.86 ^c	7.29 ^b	33.70 ^b	2.70 ^b	14.85 ^a	21.29 ^a
25	62.61 ^a	30.86 ^b	7.92 ^{ab}	35.96 ^{ab}	3.76 ^a	16.03 ^a	40.30 ^a
50	60.78 ^b	33.20 ^a	8.77 ^a	37.55 ^a	3.58 ^a	13.48 ^a	67.29 ^a
زئولیت Zeolite							
0	58.78 ^a	30.74 ^b	8.07 ^a	35.52 ^a	3.28 ^a	15.33 ^a	69.28 ^b
5	59.62 ^a	30.83 ^{ab}	7.88 ^a	44.35 ^a	3.24 ^a	14.52 ^a	1.30 ^{ab}
10	60.54 ^a	31.34 ^a	8.03 ^a	36.26 ^a	3.53 ^a	14.51 ^a	59.30 ^a

در هر ستون تیمارهایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی دار ندارند.

In each column, the data which followed by the same letter has no different significantly by the Tukey's test at 5% level of probability.



شکل 2- مقایسه میانگین اثر متقابل کادمیم و روی بر طول ریشه گیاه گل راعی

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Figure 2- Mean comparison of the interaction effect of Cd and Zn on root length of *Hypericum perforatum*.

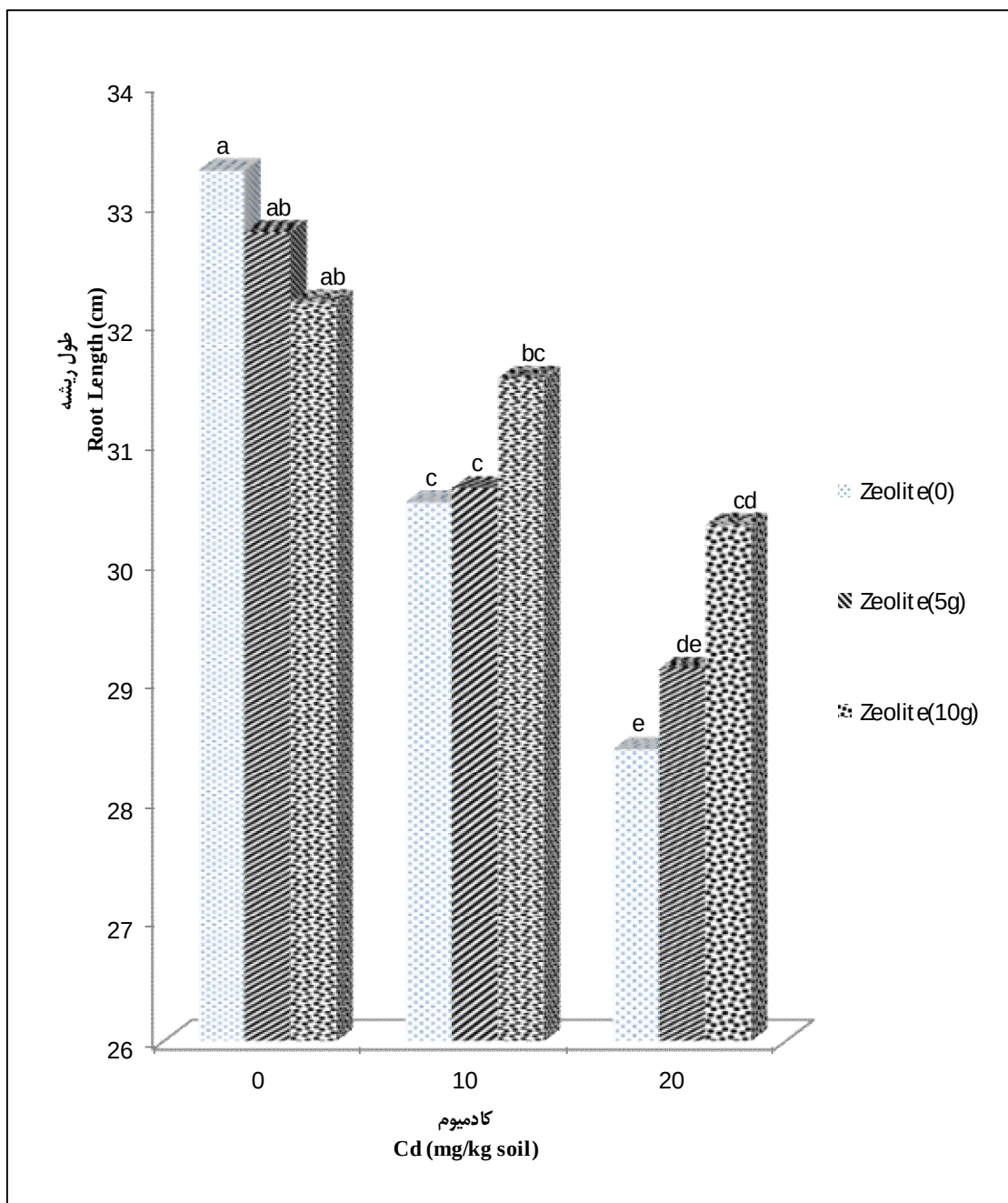
Means which followed by the same letter has no different significantly by the Tukey's test at 5% level of probability

که بیش‌ترین مقدار میانگین (9/48) در سطح صفر و کم‌ترین مقدار (7/44) در بالاترین سطح کادمیم حاصل گردید. روند معکوسی در تیمار روی (Zn) مشاهده شد به طوری که کم‌ترین تعداد ساقه‌ی گل‌دهنده (7/29) در نبود روی (Zn₀) و بیش‌ترین تعداد ساقه‌ی

تعداد ساقه‌ی گل‌دهنده در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر کادمیم و روی (Zn) قرار گرفت. ولی هیچ یک از اثرات متقابل نتوانست تأثیر معنی‌داری بر این صفت بگذارد (جدول 1). افزایش سطوح کادمیم منجر به کاهش تعداد ساقه‌ی گل‌دهنده شد به طوری

که اثر ساده‌ی کادمیوم در سطح احتمال 5 درصد و اثر ساده‌ی روی در سطح احتمال 1 درصد بر تعداد گل در بوته تأثیر معنی‌دار داشته است (جدول 1).

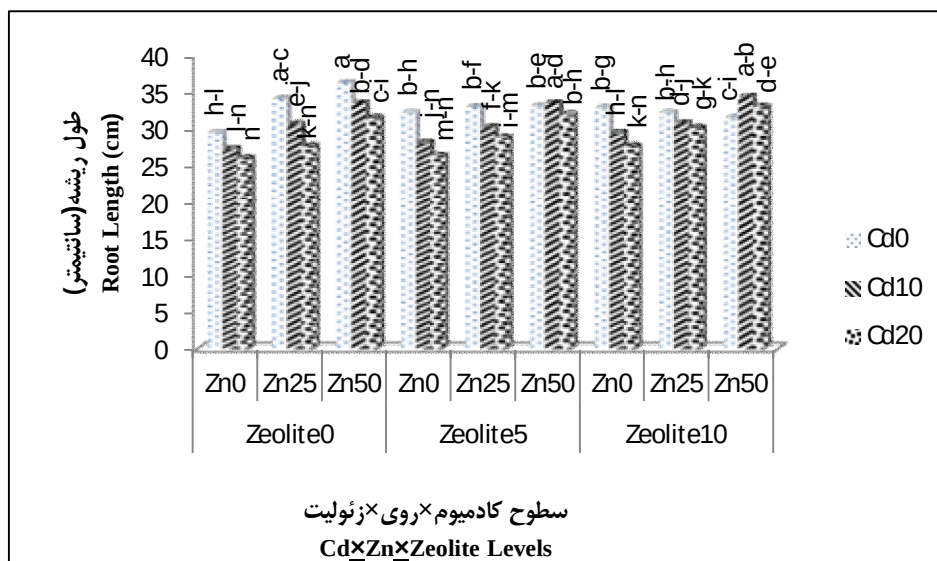
گل‌دهنده (8/77) در بیش‌ترین سطح روی (Zn_{50}) به‌دست آمد (جدول 2).
نتایج جدول تجزیه واریانس برای صفت تعداد گل نمایان می‌کند



شکل 3- مقایسه میانگین اثر متقابل کادمیوم و زئولیت بر طول ریشه‌ی گیاه گل راعی

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 3. Mean comparison of the interaction effect of Cd and Zeolite on root length of *Hypericum perforatum*.
Means which followed by the same letter has no different significantly by the Tukey's test at 5% level of probability



شکل 4- مقایسه میانگین اثرات سه گانه کادمیم* روی * زئولیت بر طول ریشه‌ی گل راعی

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 4. Mean comparison of the triple effect of Cd, Zn and Zeolite on root length of *Hypericum perforatum*. Means which followed by the same letter has no different significantly by the Tukey's test at 5% level of probability

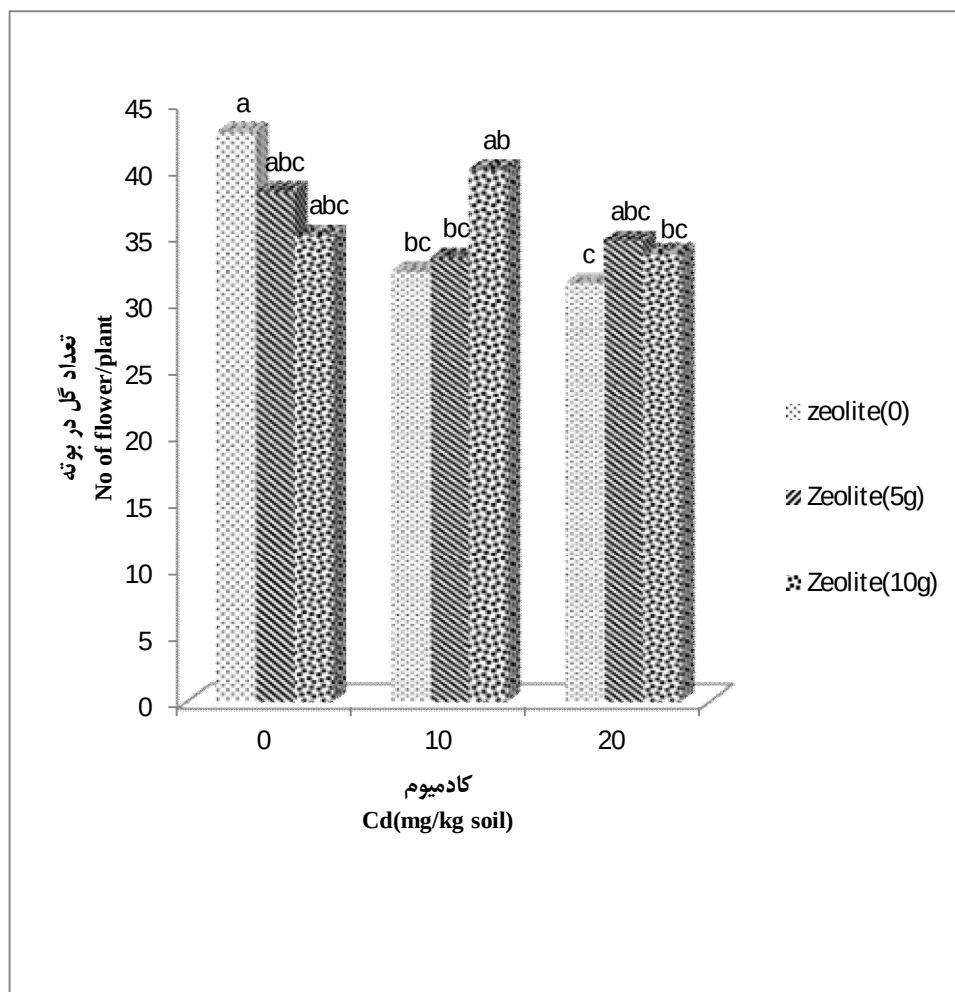
جذب آب وجود دارد که نتیجه آن کاهش فشار تورگر است. این کاهش همراه با کاهش قابلیت ارتجاعی دیواره سلول باعث کوچک شدن سلول‌ها و کاهش فضای بین سلولی در گیاهان تحت تنش با کادمیم می‌شود (32).

تعداد گرهک سیاه در برگ نیز تحت تأثیر کادمیم قرار گرفت که در بالاترین سطح کادمیم با میانگین (17/52) بیشترین تعداد گرهک سیاه در برگ به دست آمد (جدول 1). زرین کمر و همکاران (35) نیز افزایش تعداد گرهک‌های سیاه در گل راعی تحت تنش سرب اعلام کردند. افزایش مقدار متابولیت‌های ثانویه تحت تنش فلز سنگین در گل راعی و بابونه می‌تواند در ارتباط با مکانیسم کلاته کردن فلزات سنگین باشد (22).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای کلروفیل نسبی نشان داد که کادمیم در سطح احتمال 1 درصد و زئولیت در سطح احتمال 5 درصد تأثیر معنی‌داری بر این صفت داشت. ولی هیچ یک از اثرات متقابل تیمارها نتوانست اختلاف معنی‌داری در مقادیر این صفت نشان دهد (جدول 1). نتایج حاصل از مقایسه میانگین برای صفت مذکور به خوبی نشان داد که در بین سطوح کادمیم، سطح صفر کادمیم با میانگین (31/99) نسبت به دیگر سطوح بیشترین مقدار کلروفیل نسبی را به خود اختصاص داد. با افزایش مقدار زئولیت میزان کلروفیل نسبی افزایش یافت به طوری که در بالاترین سطح زئولیت، بیشترین میزان کلروفیل نسبی (30/59) به دست آمد (جدول 2).

مقایسه میانگین مربوط به صفت تعداد گل نیز نشان داد که بیشترین تعداد گل در گیاه (38/74) در غیاب کادمیم و کمترین آن (33/25) در بالاترین سطح کادمیم حاصل گردید. در تیمار روی (Zn) بیشترین تعداد گل (37/55) و کمترین تعداد (33/70) به ترتیب در کمترین و بیشترین سطوح روی به دست آمد که مؤید اثر مثبت این تیمار بر صفت مذکور است. هم‌چنین اثر متقابل کادمیم و زئولیت در سطح احتمال یک درصد برای این صفت معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین مندرج در (شکل 5) نشان داد که تیمار Cd_0Zn_0 با بیشترین تعداد گل (42/77) و تیمار $Cd_{20}Zn_0$ با کمترین تعداد گل (31/44) تفاوت معنی‌دار دارند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای صفت سطح برگ نشان داد که کادمیم و روی در سطح احتمال 5 درصد تأثیر معنی‌داری بر این صفت دارد (جدول 1). مقایسه میانگین مربوط به این صفت نیز بیانگر اثر کاهنده کادمیم است به طوری که سطح صفر کادمیم، بیشترین سطح برگ (3/80 سانتی‌متر مربع) و بیشترین سطح کادمیم، کمترین سطح برگ (2/98 سانتی‌متر مربع) را به خود اختصاص دادند. اما تیمار روی در غلظت‌های Zn_{25} و Zn_{50} مقادیر بالای سطح برگ (3/76 و 3/58 سانتی‌متر مربع) را حاصل نمود (جدول 2). بخشی از کاهش عملکرد گیاه ناشی از کادمیم زیاد به دلیل اثرات سمی کادمیم در گیاه است که باعث کاهش تعداد برگ‌ها، کاهش سطح برگ‌ها و کاهش فتوسنتز خالص و نهایتاً باعث افت عملکرد می‌شود (3). گزارشی مبنی بر تأثیرات منفی کادمیم بر سطح برگ و اختلال در



شکل 5- مقایسه میانگین اثر متقابل کادمیوم و زئولیت بر تعداد گل در گیاه

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌دار ندارند

Figure 5. Mean comparison of the interaction effect of Cd and Zeolite on Number of flower in plant.

Means which followed by the same letter has no different significantly by the Tukey's test at 5% level of probability

تحریک کمبود آهن، سیستم انتقال الکترون فتوسنتز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. روی (Zn) از طریق محافظت از گروه سولفیدریل باعث استحکام آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و ساختمان چربی غشاء سلول و باعث سنتز کلروفیل می‌شود (15). شارما و همکاران (30) نیز اعلام نمودند که کادمیم از طریق کاهش در رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش فتوسنتز باعث کاهش رشد گیاهان می‌شود.

کادمیم باعث کاهش سنتز کلروفیل از طریق جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های مؤثر در مراحل مختلف تشکیل کلروفیل از طریق اتصال به گروه سولفیدریل (-SH) می‌گردد (3) و با اختلال در فعالیت آنزیم‌های مؤثر در چرخه تثبیت گاز کربن و واکنش‌های نیازمند به نور و بی‌نیاز از نور باعث اختلال در فتوسنتز می‌شود (6). افزایش کادمیم در محیط رشد گیاهی، جذب و توزیع آهن را کاهش می‌دهد (36) و با

منابع

- 1- Adiloglu A. 2002. The effect of zinc (Zn) application on uptake of cadmium (Cd) in some cereal species. Journal of Soil Science, 48: 553-556.
- 2- An Y.J. 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environmental Pollution, 127: 21-26.
- 3- Aravind P., and Prasad M.N.V. 2004. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. Journal of Plant Science, 166: 1321-1327.

- 4- Azizi M. 2000. The effect of environmental and physiological factors on growth, functional and active metabolites of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) in the field and in vitro conditions. PhD thesis, University of Tarbiat Modarres.(in Persian)
- 5- Behtash F., Tabatabaei J., Malakuti M.J., Sarvaldin M.H. and Oustan Sh. 2010. Effect of zinc and cadmium on growth, chlorophyll content, photosynthesis and cadmium concentration in beet. Journal of Soil Science (water and soil), 24 (1): 31-41.(in Persian)
- 6- Chug L.K. and Sawhney S.K. 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. Plant Physiology and Biochemistry, 37: 297-303.
- 7- Gairola C.G., Wagner G.J. and Diana J.N. 1992. Tobacco: Cd and health. Journal of Smoking-related disorders, 3:3-6.
- 8- Gholizadeh A. 2004. Effects of drought stress and using of natural zeolite on physiomorphological properties of *Dracocephalum moldavica* medicinal plant. p. 27-39. Master thesis. Guilan University.(in Persian)
- 9- Gouia H., Ghorbal M.H. and Meyer C. 2001. Effect of cadmium on activity of nitrat reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. Plant Physiology, 38: 629-638.
- 10- Grant C.A., Buckley W.T., Bailey L.D. and Selles F. 1998. Cadmium accumulation in crops. Canadian Journal of Plant Science, 78: 1-17.
- 11- Kabata-Pendias A. and Pendias H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. Crc Press, Boca Raton. Florida. USA.
- 12- Kazemian H. 2004. Introduction to Zeolites, Magic Minerals. Paradise Publications. Tehran.(in Persian)
- 13- Kirakosyan A., Sirvent T.M., Giuson D.M. and Kaufman P.B. 2004. The production of hypericins and hyperforin by in vitro culture of St Johns Wort (*Hypericum perforatum* L.). Biotechnology and Applied Biochemistry, 39: 71-81.
- 14- Král'ová K. and Masarovičová E. 2003. *Hypericum perforatum* L. and *Chamomilla recutita* L. Rausch. Accumulators of some toxic metals. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 58: 359-360.
- 15- Krupa Z. 1988. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. Journal of Physiology Plant, 73: 518- 524.
- 16- Kukier U., Peters C.A., Chaney R.L., Angle J.S. and Roseberg R.J. 2004. The effects of pH on metal accumulation in two *Allysum* species. Journal of environmental Quality, 33: 2090-2102.
- 17- Kummerova M., Zezulka S., Kralova K. and Masarovicova E. 2010. Effect of zinc and cadm-ium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. Biologia Plantarum, 54: 308-314.
- 18- Li S.L., Wang H.X. and Wu Y.S. 1990. Antagonistic effect of zinc on cadmium in water hyacinth. Acta Scientiae Circumstantiae, 10: 244-249.
- 19- Long X.X., Yang X.E., Ni W.Z., Ye Z.Q., He Z.L., Calvert D.V. and Stoffela J.P. 2003. Assesing zinc thresholds for phytotoxic and potential dietary toxicity in selected vegetable crops. Commun Soil Science Plant Anal, 34: 1421-1434.
- 20- Mackenna I.M., Chaney R.L. and Williams F.M. 1993. The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach. Journal of Environmental Pollution, 79: 113-120.
- 21- Mahmood-abadi M.K., Ronaghi A., Khayyat M. and Hadarbodi Gh. 2009. Effect of zeolite and cadmium on growth and chemical system. Australian Journal of Crop Sience, 10: 515-521.
- 22- Masarovičová E. and Král'ová K. 2007. Medicinal plants-past, nowadays, future. Acta Horticulturae, 749: 19- 27.
- 23- Masarovicova E. Kralova k. 2012. Plant-Heavy Metal Interaction: Phytoremediation, Biofortification and Nanoparticles. Comenius University public in Bratislava. Slovakia.
- 24- Mumpton F.A. 1996. Mineralogy and geology of natural zeolite. Department of the Art Science. University of New York, USA.
- 25- Nan Z., Li J., Zhang J. and Cheng G. 2002. Cadmium–zinc and their transfer in soil-crop system under actual field conditions. Science of the Total Environment, 285: 187-195.
- 26- Nava I., Garcia-Sosa I. and Solache-Rios M. 1995. Removal of Co and Cd by Zeolite. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 191: 83-87.
- 27- Piotrowska M., Dudka S. and Chlopecka A. 1994. Effect of elevated concentrations of Cd and Zn in soil on spring wheat yield and metal contents of the plants.Water Air Soil Pollution, 76: 333-341.
- 28- Rahimi, T. and Ronaghi, A. 2012. The effect of different sources using of zinc on cadmium concentrations and some micronutrients in spinach in a lime soil. Journal of Greenhouse Sciences and Technologies. Third year. Tenth number.(In Persian)
- 29- Salt D.E., Blaylock M. and Kumar N.P.B. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic elements from the environment using plant. Biotechnology, 13: 468-474.
- 30- Sharma R.K., Agrawal M. and Agrawal S.B. 2008. Interactive effects of cadmium and zinc on carrots: Growth and biomass accumulation. Journal of Plant Nutrition, 31: 19-34.

-
- 31- Shute T. and Macfie S.M. 2006. Cadmium and zinc accumulation in soybean: A threat to food safety? Science Total Environment, 371: 63-73.
 - 32- Vassilev A., Lidon C.F., Matos M.D.C., Ramalho J.C. and Yordanov I. 2002. Phytosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium and copper treated barley plants. Journal of Plant Nutrition, 25: 2343-2360.
 - 33- Yang X.E., Ye H.B., Long X.X., He B., He Z.L., Stoffella P.J. and Calvert D.V. 2004. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). Plant and Soil, 259: 181-189.
 - 34- Yoo M.S. and James B.R. 2003. Zinc exchangeability as a function of pH in citric acid-amended soils. Soil Science, 168: 356-367.
 - 35- Zarinkamar F., Ghelich S., and Soleimanpour S. 2013. Toxic Effects of Pb on Anatomy and Hypericin Content in *Hypericum perforatum* L., Bioremediation Journal, 17: 40-51.
 - 36- Zornoza P., Va`zquez S., Esteban E., Ferna`ndez-Pascual M. and Carpena R. 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 1003-1009.



The Effect of Cadmium, Zinc and Zeolite Application on Physiomorphological Characteristics of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)

Zh. Zandavifard^{1*}- M. Azizi²- H. Aroiee³- A. Fotovvat⁴

Received: 31-08-2015

Accepted: 02-02-2016

Introduction: Among the heavy metals, cadmium, because of high mobility and bioavailability in soil and also toxicity at low concentrations is very important. Cadmium (Cd) is known as carcinogen and can induce many types of cancers. Human activities (metallic industries, contaminated fertilizer, herbicides or insecticides, irrigation with contaminated groundwater, and use of contaminated sewage sludge) are largely responsible for accumulation of different levels of Cd in soil. Saint John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) is a medicinal plant and belongs to the family Hypericaceae which its extract, one of the best-characterized herbal medicines, known as the Cd-hyperaccumulator, is widely sold for the treatment of depression. Hyperaccumulator plants are species able to accumulate high amounts of heavy metals in their tissue at concentrations of 10 to 100 times higher than tolerated by crop plants. Zinc (Zn) is an essential element occurring in several enzymes, where it plays a catalytic or structural role. Cadmium and zinc have similar electron configuration, valence state as well as affinity to S, N and O donor ligands and thus their geochemical and environmental properties are comparable. The antagonism activity between Cd and Zn in the environment and their chemical similarity can lead to interactions between Cd and Zn during plant uptake, transport from roots to shoots, or accumulation in edible tissues. Ion exchange is one of the methods used for the removal of several toxic substances. In recent years, natural amendments, such as zeolite have been widely used to address trace metals contamination. Therefore, adding zinc and zeolite to the growth medium of plant can be moderating the toxic effects of cadmium.

Materials and Methods: This pot experiment was conducted at the Experimental Field of Ferdowsi University of Mashhad (FUM) from September 2013 to June 2014. Treatments consisted of three levels of cadmium (0, 10 and 20 mg Cd kg⁻¹ soil), three levels of zinc (0, 25 and 50 mg Zn kg⁻¹ soil) and three levels of Zeolite (Clinoptilolite) (0, 5 and 10g zeolite kg⁻¹ soil) arranged in a factorial based on Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications. Cadmium sulfate (CdSO₄·4H₂O) and zinc sulfate (ZnSO₄·7H₂O) were purchased from MERCK company. The zeolite used in this research was collected from the Semnan mine, located in South of Semnan Province. After preparing the soil, the pots (30 cm in diameter with 18 kg capacity) were filled with 18 kg soil and thoroughly mixed with appropriate amounts of cadmium, zinc and zeolite diluted in distilled water. Seeds of *H. perforatum* L. cv. "Topaz" were obtained from the FUM Research Field. After 24 hours of soaking in tap water, the seeds were sown on the surface of moistened soil in each pot and germinated after 10 days. Following germination, the seedlings (about 1.0 cm high) were thinned and only 10 seedlings in each pot were kept. At the full flowering stage, these plants were harvested after 9 months. Plant height, root length, flowering stem and flower number, leaf area, relative chlorophyll and number of black nodules was measured. Chlorophyll (Chl) content were determined by leaf area meter (Li-Cor-1300, USA) and SPAD chlorophyll meter. Data were analyzed statistically by using JMP 8 and Excel software. The differences between averages were tested by Tukey's test at P < 0.05.

Results and Discussion: The results showed that increasing cadmium levels lead to significant decrease of 6.28, 3.45, 2.04, 5.49, 0.82, 15.71 percents in plant height, root length, flowering stem, flower number, leaf area and relative chlorophyll, respectively compared with control. In comparison to control, the number of black nodules in leaf significantly increased by 4.23 percent. Combined application of cadmium and zinc could significantly decline the effects of cadmium on plant height and root length. Meanwhile, interaction effect of cadmium and zeolite was detected significantly on root length and number of flowers. The results of three-way interactions for root length were superior in Zn₀Cd₀Zn₁₀ treatment. Cadmium is an inhibitor of uptake and accumulation of essential mineral nutrients, reduces conductivity of stomata and water potential of cells and damaged photosystems; therefore, can decrease biomass production in stem, flower and root. The reduction of Chl content could lead to enzymatic degradation of these pigments or inhibition of their biosynthesis, which could be connected with Cd-induced deficiency of iron and zinc, decrease of magnesium content or cadmium bond to essential thiol groups in both the protochlorophyllide reductase protein and other enzymes involved in

1, 2 and 3- PhD Student of Medicinal Plants Physiology and Breeding, Professor and Associate Professor, Department of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad

(*- Corresponding Author Email: zh.zandavifard@yahoo.com)

4- Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

the light dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid. Heavy metal stress with impact on biosynthetic pathways of pharmacologically active molecules can either increase or decrease them. Changes in black nodules number, containing hypericin and other secondary metabolites in *H. perforatum* in response to heavy metals can help us understand the role of this material in stress conditions. It could be assumed that high metal accumulating ability of plants producing specific secondary metabolites in *H. perforatum* could be also connected with chelation of toxic metals with mentioned substances.

Conclusions: Our results confirmed that the addition of zeolite and zinc presumably improved plant growth, because of increased availability of essential nutrient elements such as K, Mg, Ca, NH₄, and micronutrients in presence of zeolite or decreased Cd sorption and transmission in presence of zinc.

Keywords: Cd-hyperaccumulator, Cadmium sulfate, Clinoptilolite, Medicinal plants, Zinc sulfate



بررسی اثر سالیسیلیک اسید در جلوگیری از آسیب سرما در گوجه فرنگی گیلاسی (*Lycopersicon esculentum* cv. Messina)

حنیفه سید حاجی زاده^{*1} - شهلا صفخانی²

تاریخ دریافت: 1394/09/09

تاریخ پذیرش: 1395/12/08

چکیده

سرما یکی از عوامل محدود کننده در تولید گوجه فرنگی محسوب می‌شود. تحمل به سرما در طی انبارداری یکی از شاخصه های مهم نگهداری محصولات باغی به شمار می‌رود. در این راستا آزمایش فاکتوریل برپایه طرح کاملاً تصادفی به منظور اثر تیمار سالیسیلیک اسید در دوره های پیش و پس از برداشت روی ماندگاری گوجه فرنگی گیلاسی در دمای پایین انجام شد. بوته ها یکبار در مرحله تشکیل میوه با آب مقطر و سالیسیلیک اسید 0/75 میلی مولار و بار دوم میوه های هر دو بوته در مرحله رسیده کامل با همان غلظت های سالیسیلیک اسید تیمار شده (آب مقطر- آب مقطر، آب مقطر- سالیسیلیک اسید، سالیسیلیک اسید- آب مقطر، سالیسیلیک اسید- سالیسیلیک اسید) و به مدت 5 هفته در دمای 1 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که اثر سالیسیلیک اسید در مرحله پیش از برداشت بر روی آسیب سرمازدگی معنی دار بود و میوه های شاهد و تیمار شده به ترتیب 16/66 و 1/38 درصد آسیب را داشتند. بیشترین میزان مواد جامد محلول کل در هفته پنجم و اسیدیته در هفته چهارم مربوط به ترکیب تیماری سالیسیلیک اسید- آب مقطر می باشد که نشان می دهد تیمار پیش از برداشت سالیسیلیک اسید ضمن افزایش خصوصیات کیفی میوه، میزان پرولین و کربوهیدرات و افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز موجب کاهش آسیب غشای سلول شد. بطور کلی تاثیر تیمار پیش از برداشت سالیسیلیک اسید در حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری گوجه فرنگی گیلاسی محسوس تر از تیمار پس از برداشت بود ولی با این وجود میوه های شاهد بهترین طعم را نسبت به سایر تیمارها در هفته پنجم داشتند.

واژه های کلیدی: تنش سرما، گوجه چری، عمر انباری و کیفیت میوه

مقدمه

فاز از مایع کریستالی انعطاف پذیر به ساختار ژلی جامد قرار می گیرند (22). گوجه فرنگی حساسیت بالایی به سرمازدگی داشته و نگهداری آن در دمای زیر 12 درجه سانتی گراد موجب ایجاد سرمازدگی می شود (46). گوجه فرنگی گیاهی علفی و یکساله است که بعد از سبب زمینی مهمترین گیاه خانواده Solanaceae می باشد و به عنوان یکی از مهمترین سبزی ها در رژیم غذایی مردم سراسر جهان محسوب می شود. متأسفانه هر سال بخش زیادی از میوه ها و سبزی های تولید شده به شکل ضایعات از بین می روند که این امر باعث کاهش دسترسی اقشار مختلف به مواد غذایی به ویژه میوه ها و سبزی ها می شود و موجب افزایش هزینه های تولید می شود (25). به دلیل فسادپذیری میوه ها و سبزی ها، استفاده از فناوری های نوین برای جلوگیری از ضایعات پس از برداشت این محصولات بسیار ضروری می باشد (28). امروزه برای بالا بردن میزان بهره وری و استفاده بهتر از منابع کار و کارگر، انرژی و سرمایه، به جای افزایش در تولید، توجه و تأکید بیشتری روی نگهداری پس از برداشت

یکی از مشکلات اصلی محصولات گرمسیری و نیمه گرمسیری در دوره پس از برداشت حساسیت آن ها به دمای پایین می باشد که منجر به ایجاد آسیب سرمازدگی می شود. آسیب سرمازدگی انبارمانی این محصولات را محدود کرده و منجر به کاهش معنی داری در کیفیت محصول می گردد (47) که در درجه حرارت های پایین اما نه درجه حرارت هایی که منجر به یخ زدگی شود و در درجه حرارت های 0-15 درجه سانتی گراد ایجاد می شود (26). غشای سلولی اولین حسگر سرما در سلول بوده و اولین مکان برای توسعه آسیب سرمازدگی می باشد. غشای سلولی در بافت های سرمازده تحت انتقال

1 و 2- دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

(*- نویسنده مسوول: (Email: hajizade@maragheh.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.51793

انجام شد. فاکتورهای این آزمایش شامل تیمار سالیسیلیک اسید به صورت اسپری قبل از برداشت در مرحله تشکیل میوه و غوطه وری پس از برداشت و زمان نمونه برداری بود. تیمارهای قبل از برداشت در مرحله میوه بندی در دو سطح شاهد (آب مقطر) و اسیدسالیسیلیک 0/75 میلی مولار به صورت اسپری انجام شد. بعد از برداشت محصول جهت انجام تیمارهای پس از برداشت از میوه های قرمز رسیده از هر دو بوته که پیش از برداشت مورد تیمار قرار گرفته بودند، استفاده شد و سپس تیمارها در دو سطح شاهد و غوطه وری در 0/75 میلی مولار اسید سالیسیلیک (آب مقطر - آب مقطر، آب مقطر - سالیسیلیک اسید، سالیسیلیک اسید - آب مقطر، سالیسیلیک اسید - سالیسیلیک اسید) به اجرا در آمد. سپس تیمارها به دمای یک درجه سانتی گراد منتقل شدند. نمونه برداری از میوه ها به صورت هفتگی و در طی 5 هفته انجام شد. در آخرین هفته آزمایش، میوه ها به مدت سه روز در دمای معمول اتاق (25-24 درجه سانتی گراد) قرار گرفتند تا اثر سرمازدگی در کل دوره ارزیابی گردد.

شاخص های اندازه گیری شده

مواد جامد محلول (TSS) کل توسط دستگاه رفاکتومتر دیجیتالی اندازه گیری شد. درصد مواد جامد محلول کل براساس درجه بریکس بیان شد (Brix=0-32%). شاخص طعم (TSS/TA) از نسبت مواد جامد محلول به اسیدیت بدست آمد.

اسیدیت قابل تیتراسیون (TA) با سدیم هیدروکسید 0/1 نرمال اندازه گیری شد. سپس درصد اسیدیت به استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\times \left(\frac{\text{میلی اکی والان اسید غالب میوه} \times \text{نرمالیت سود} \times \text{میلی لیتر سود مصرفی}}{\text{میلی لیتر حجم آب میوه}} \right) = \text{اسیدیت} (\%)$$

$$0/064100 = \text{میلی اکی والان اسید غالب میوه}$$

درصد کاهش وزن میوه ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\frac{(M1 - M2)}{M1} \times 100 = \text{درصد کاهش وزن} (\%)$$

وزن ثانویه: M2 وزن اولیه: M1

آسیب سرمازدگی مطابق روش دینگ و همکاران (19) انجام گرفت.

$$(\%) \text{ شاخص آسیب سرمازدگی} = \sum \left(\frac{(\text{تعداد میوه های سرمازده}) \times (\text{سطح سرمازدگی})}{(\text{تعداد میوه های آزمایش}) \times 4} \times 100 \right)$$

پرولین: میزان پرولین با روش ارائه شده توسط ایریگوین و همکاران (17) تعیین گردید. جذب در طول موج 515 نانومتر قرائت گردید. میزان پرولین با واحد میکروگرم بر گرم وزن تر بیان شد.

کربوهیدرات کل: میزان کربوهیدرات کل در نمونه ها به روش

فرآورده های کشاورزی می شود (43). استفاده از مواد شیمیایی در رفع خطر سرمازدگی اثرات سوئی در تغذیه دارد، از این رو استفاده از سالیسیلیک اسید به عنوان ماده ای مفید در حال حاضر رو به رواج است (43). سالیسیلیک اسید متعلق به گروهی از ترکیبات فنلی است که به طور وسیعی در گیاهان وجود دارد و امروزه به عنوان ماده شبه هورمونی محسوب می گردد. این گروه از ترکیبات به عنوان تنظیم کننده رشد عمل می کنند. سالیسیلیک اسید یا اسید اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، یک تنظیم کننده ی رشد درونی از گروه ترکیبات فنلی طبیعی می باشد که در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه نقش دارد (27). سالیسیلیک اسید به عنوان یک مولکول سیگنالی درونی نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاهان و پاسخ به تنش های محیطی بازی می کند و علاوه بر اینکه نقش مهمی در برابر تنش های زنده در گیاهان ایفا می کند، در برطرف کردن اثر سوء تنش های غیر زنده مثل دمای پایین نیز نقش مهمی دارد و آسیب سرمازدگی را در پس از برداشت در میوه ها و سبزیجات با مکانیسم های مختلف مثل افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی کاهش می دهد (43). این ماده در گوجه فرنگی و لوبیا نیز سبب افزایش مقاومت به درجه حرارت های پایین و بالا شده است (31).

نتایج حاصل از تحقیقات سلیمانی اقدم و همکاران (37) نشان داد که اسید سالیسیلیک در غلظت یک میلی مولار بیشترین تاثیر را در کاهش میزان سرمازدگی، نشت یونی و میزان مالون دی آلدئید و همچنین افزایش میزان پرولین میوه ها داشته است. تیمار اسید سالیسیلیک با کاهش معنی دار فعالیت این آنزیم ها در طول دوره نگهداری در دمای سرمازدگی منجر به افزایش انسجام غشای سلولی گردید (37). تیمار با سالیسیلیک اسید در غلظت 500 میکرومولار مانع کاهش شدید گل و میوه گردید اما در غلظت های بالاتر نتوانست از این کاهش جلوگیری کند. خصوصیات کیفی میوه شامل Brix، pH و EC تحت تنش خشکی افزایش یافتند و استفاده از سالیسیلیک اسید تا غلظت 500 میکرومولار از افزایش این فاکتورها جلوگیری کرد (1). در آزمایشی اثر سالیسیلیک اسید در مراحل مختلف رشد گوجه فرنگی بر روی خصوصیات کمی و کیفی این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که به طور کلی استفاده از سالیسیلیک اسید با غلظت 4-10 مولار در تیمار محلول پاشی از ابتدا تا انتهای کشت باعث افزایش سفتی و ضخامت پوست میوه می شود که برای کارخانجات صنایع تبدیلی و به ویژه در صنعت فرایندسازی این میوه از اهمیت زیادی برخوردار است (2). در این پژوهش سعی شد اثر سالیسیلیک اسید روی افزایش تحمل به سرمازدگی گوجه فرنگی گیلاسی ارزیابی شود.

مواد و روش ها

این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه مراغه در تابستان سال 1393

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تعیین اثر اسیدسالیسیلیک روی درصد آسیب دیدگی گوجه‌فرنگی گیلاسی، تجزیه واریانس به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. برای سایر صفات آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای این آزمایش شامل تیمار سالیسیلیک اسید به صورت اسپری قبل از برداشت در مرحله تشکیل میوه و غوطه‌وری پس از برداشت، هر یک در دو سطح با آب مقطر و 0/75 میلی‌مولار سالیسیلیک اسید و شش زمان نمونه‌برداری بود. داده‌های به دست آمده به وسیله نرم افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن به منظور مقایسه میانگین تیمارها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

شاخص سرمازدگی: نتایج نشان داد که اسید سالیسیلیک تأثیر معنی‌داری در کاهش آسیب سرمازدگی در میوه‌های گوجه فرنگی گیلاسی در طی مدت زمان نگهداری داشت ($P \leq 0/01$). میوه‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید در مرحله قبل از برداشت که تیماری بعد از برداشت دریافت نکرده بودند دارای کمترین درصد سرمازدگی بود، در مقابل میوه‌های شاهد، بیشترین درصد سرمازدگی را نشان دادند (جدول 1).

ایریگوین و همکاران (17) اندازه‌گیری شد. جذب در طول موج 625 نانومتر قرائت گردید. میزان کربوهیدرات با واحد میکروگرم بر گرم وزن تر بیان شد.

میزان مالون دی آلدئید: مالون دی آلدئید مطابق روش بولی و استوارت (35) اندازه‌گیری شد و از میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های 532 و 600 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر و میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین طول موج‌های جذبی در ضریب خاموشی $155 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد. بر حسب نانومول بر گرم وزن تازه ($\text{nmol.g}^{-1} \text{ Fresh weight}$) بیان شد.

سنجش میزان پروتئین کل: برای سنجش مقدار پروتئین کل به اقتباس از روش بردفورد (6) عمل شد. میزان پروتئین کل برای تک‌تک نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ($\text{mg.g}^{-1} \text{ Fresh weight}$) محاسبه گردید.

سنجش میزان گایاکول پراکسیداز: میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز موجود در بافت میوه‌ها با استفاده از روش منکارلی و همکاران (1995) اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب میکرومول گایاکول اکسید شده در دقیقه بر گرم وزن تازه ($\mu\text{mol guaiacol.min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ Fresh weight}$) بیان شد.

پراکسید هیدروژن: میزان پراکسید هیدروژن به روش سرگیو و همکاران (34) اندازه‌گیری شد. میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 390 نانومتر قرائت گردید. سپس مقدار پراکسید هیدروژن با واحد میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید.

جدول 1- مقایسه میانگین اثرات اسیدسالیسیلیک روی صفت آسیب سرمازدگی گوجه فرنگی گیلاسی

Table 1- Compares the average effect of salicylic acid on chilling injury of cherry tomato

تیمار Treatment	آسیب سرمازدگی Chilling injury (%)
آب مقطر - آب مقطر (T ₀₀) distilled water	16.66 ^a
آب مقطر - سالیسیلیک اسید (T ₀₁) distilled water-salicylic acid	12.49 ^{ab}
سالیسیلیک اسید - آب مقطر (T ₁₀) salicylic acid-distilled water	1.387 ^c
سالیسیلیک اسید - سالیسیلیک اسید (T ₁₁) salicylic acid-salicylic acid	8.33 ^b

حروف هم نام اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test

اشباع در غشای سلولی اتفاق می‌افتد و باعث پراکسید شدن لیپیدهای غشاء و در نهایت باعث نفوذپذیری انتخابی و نشت یون‌ها به بیرون سلول می‌شود (17). احتمالاً سالیسیلیک اسید استفاده شده در مرحله پیش از برداشت نقش زیادی در پایداری غشاء گوجه فرنگی گیلاسی داشته است و باعث ثبات غشاء و جلوگیری از آسیب سرمازدگی شده است.

نتایج ما با یافته‌های حاصل از پژوهش سلیمانی اقدم و همکاران (37) در گوجه فرنگی و ابراهیم زاده و همکاران در نارنگی کینو (12) مطابقت داشت. اولین خسارت تنش سرما، اختلال در عملکرد غشاء و نفوذپذیری انتخابی آن است که موجب نشت یون‌ها به خارج از سلول شده و باعث افزایش رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌شود و بنابراین واکنش رادیکال‌های آزاد با اسیدهای چرب غیر

میزان مواد جامد محلول (TSS): نتایج نشان داد که اثر متقابل تیمار×زمان بر روی میزان مواد جامد محلول کل در سطح احتمال پنج درصد معنی دار می باشد (جدول 2).

جدول 2 - تجزیه واریانس اثرات اسید سالیسیلیک روی اسیدیته، مواد جامد محلول کل و کاهش وزن گوجه فرنگی گیلاسی در طی زمان
Table 2- ANOVA of the effect of salicylic acid on acidity, total soluble solids and weight loss of cherry tomato during time

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degrees of Freedom	میانگین مربعات Mean of Squares		
		اسیدیته Acidity	مواد جامد محلول کل Total Soluble Solids	کاهش وزن Weight Loss
تیمار Treatment	3	0.057**	0.544 ^{ns}	0.166 ^{ns}
زمان Time	5	0.140**	1.939**	2.984**
تیمار×زمان Treatment × Time	15	0.009*	0.641*	0.167 ^{ns}
اشتباه آزمایشی Error	46	0.004	0.30	0.136
ضریب تغییرات (%) CV		9.80	6.26	44.24

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطوح 5 و 1 درصد احتمال
ns, * and **: non-significant and significant at 5 and 1 % levels of probability, respectively.

احتمالا دلیل اصلی افزایش مواد جامد محلول در آخرین هفته پس از برداشت به دلیل سوخت و ساز اسیدهای آلی میوه در جریان تنفس و نیز احتمالا کاهش آب میوه ها و تبدیل نشاسته به قندهای محلول می باشد. میوه های انبه تیمار شده با سالیسیلیک اسید با غلظت 2 میلی مولار طی نگهداری در انبار سرد تفاوت معنی داری در مقدار مواد جامد محلول نشان ندادند (10) که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. این در حالیست که کاربرد سالیسیلیک اسید بر روی انار رقم ملس ساوه در میزان مواد جامد محلول در طی انبارداری بهبود یافت (32) که با یافته های ما مطابقت ندارد.

کاهش وزن: کاهش وزن میوه ها در طی انبارداری در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول 2) و از ابتدای روز انبارداری تا انتهای هفته پنجم درصد کاهش وزن میوه ها افزایش یافت بطوریکه بیشترین کاهش وزن مربوط به هفته پنجم آزمایش بود (شکل 3). ولی اثر تیمار اسید سالیسیلیک روی کاهش وزن تأثیر معنی داری نداشت. رستگاری و همکاران (30) در میوه انار و ربیعی و همکاران (29) در مطالعاتش بر روی انار رقم میخوش به این نتیجه رسیدند که تیمار سالیسیلیک اسید تأثیری در کاهش وزن میوه ها نداشته است که با این نتایج همخوانی دارد.

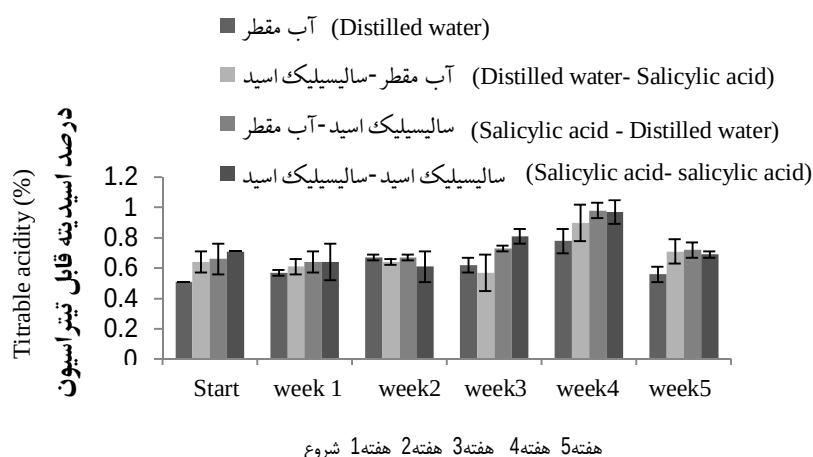
از دلایل کاهش وزن در طول زمان میتوان به تنفس، خسارت وارده به غشای سیتوپلاسمی و افزایش تراوایی غشای سلول اشاره کرد. طبق گزارش چن و همکاران (8) میوه لیمو رقم ویلا فرانکا در طی نگهداری در دمای 2 درجه سانتی گراد در اثر تنش دما کاهش وزن بیشتری داشتند که این افزایش به طور عمده به علت ایجاد شکاف و پوست مردگی های ناشی از سرمازدگی روی پوست می باشد. به نظر می رسد در طی دوره انبارداری افزایش تبخیر و تعرق از سطح

اسیدیته قابل تیتراسیون (TA): نتایج نشان داد که اثر متقابل اسید سالیسیلیک در زمان در مقدار اسیدیته میوه ها در سطح احتمال 5 % معنی دار شد (جدول 2). همانطور که مشاهده میشود اعمال تیمار سالیسیلیک اسید در پیش از برداشت تأثیر بیشتری در حفظ کیفیت میوه های گوجه فرنگی گیلاسی و سرمازدگی داشت (شکل 1).

استفاده از سالیسیلیک اسید می تواند به دلیل کاهش میزان تنفس و تولید اتیلن منجر به کاهش استفاده از اسیدهای آلی به عنوان سوسترای تنفسی شود. طبق بررسی که بر روی میوه موز و هلو انجام شده است نشان داد که استفاده از سالیسیلیک اسید میزان تنفس را در بافت ها کاهش داده و نقطه اوج فرازگرایی را به تعویق می اندازد و باعث حفظ اسیدهای آلی نسبت به میوه های شاهد می شود (15). در کل میزان اسیدیته قابل تیتراسیون با افزایش مدت انبارمانی کاهش می یابد (21). احتمالا علت کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون در طی دوره انبارمانی و پس از آن مصرف اسیدیته (اسیدهای آلی) به عنوان سوسترای فرایند تنفس است. در آزمایش انجام شده استفاده از 0/75 میلی مولار سالیسیلیک اسید در محله پیش و پس از برداشت و اسپری آن در مرحله قبل برداشت موجب حفظ مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون شده است به طوری که بیشترین میزان آن در هفته چهارم آزمایش است.

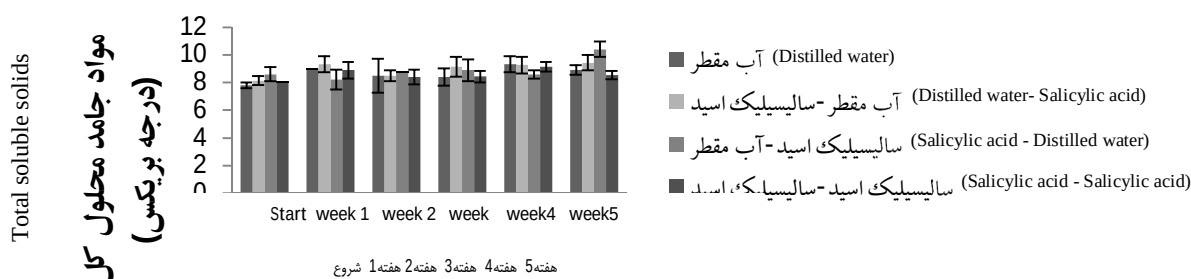
مواد جامد محلول کل (TSS): در بررسی اثر متقابل تیمار×زمان بر میزان مواد جامد محلول، مشاهده شد که میوه های تیمار شده با سالیسیلیک اسید 0/75 میلی مولار پیش از برداشت، 5 هفته پس از برداشت دارای مواد جامد محلول بیشتری نسبت به میوه های شاهد بودند (شکل 2).

میوه مهمترین عامل کاهش وزن میوه می باشد.



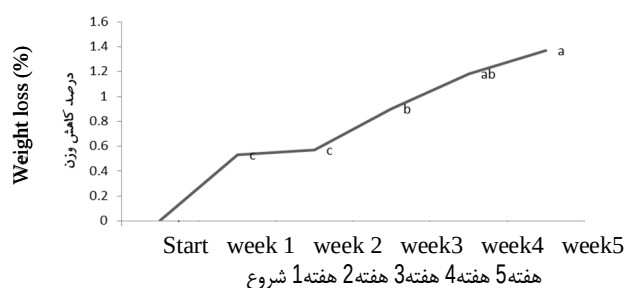
شکل 1- برهمکنش زمان $\times$ سالیسیلیک اسید روی اسیدیته میوه گوجه فرنگی گیلاسی
بارهای روی ستون ها نشاندهنده ی انحراف معیار میانگین ها هستند

Figure1- Interaction effect of salicylic acid $\times$ time on the acidity of cherry tomato fruit
Bars in column indicate standard error of means



شکل 2- برهمکنش زمان $\times$ اسید سالیسیلیک روی مواد جامد محلول کل میوه گوجه فرنگی گیلاسی
بارهای روی ستون ها نشاندهنده ی انحراف معیار میانگین ها هستند

Figure2- Effects of salicylic acid and time on the total soluble solids of cherry tomato fruit
Bars in clumn indicadestandard error of means



شکل 3- اثر زمان روی کاهش وزن میوه گوجه فرنگی گیلاسی

حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن ندارند

Figure3- Effect time on weight loss cherry tomato fruit

Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test

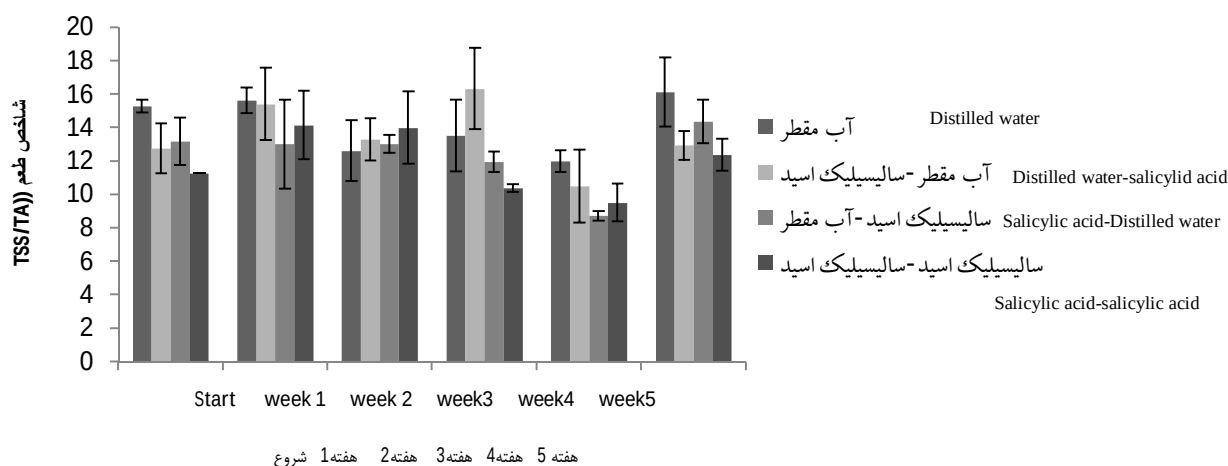
جدول 3- تجزیه واریانس اثرات اسید سالیسیلیک روی شاخص طعم میوه گوجه فرنگی گیلاسی در طی زمان
Table 3- Analysis of variance effects of salicylic acid on taste index (TSS/TA) of cherry tomato fruit during time

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی	شاخص طعم TSS/TA
تیمار Treatment	3	19.30**
زمان Time	5	27.12**
تیمار×زمان Treatment × Time	15	5.52**
اشتباه آزمایشی Error	48	2.34
ضریب تغییرات CV %		11.77

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطوح 5 و 1 درصد احتمال
ns, * and **: non-significant and significant at 5 and 1 % levels of probability, respectively.

اسید سالیسیلیک در زمان روی شاخص طعم در سطح احتمال یک درصد معنی دار می باشد (جدول 3) و نتایج اثر متقابل تیمار در زمان نشان داد میوه های شاهد در هفته پنجم دارای طعم بهتر و بیشتری نسبت به سایر میوه های تیمار شده دارند (شکل 4).

شاخص طعم (TSS/TA): برای محاسبه شاخص طعم یکه یکی از صفات کیفی میوه بوده و نمایانگر طعم میوه می باشد از نسبت میزان مواد جامد محلول به اسیدیته قابل تیتراسیون استفاده گردید. نتایج نشان داد که اثر تیمار سالیسیلیک اسید و زمان و نیز اثر متقابل



شکل 4- برهمکنش زمان × سالیسیلیک اسید روی شاخص طعم میوه گوجه فرنگی گیلاسی
بارهای روی ستون ها نشان دهنده انحراف معیار میانگین ها هستند

Figure 4- Interaction effects of salicylic acid × time on the taste index of cherry tomato fruit
Bars in column indicate standard error of means

نسبت به هفته اول کاهش داشته است (شکل 5).
احتمالا به دلیل کاهش سنتز مجدد پروتئین و تخریب قابل توجه پروتئین در طی گذر زمان می باشد که نتایج ما با یافته های ارشادی و همکاران (11) در میوه انگور بیدانه سفید و زینالی یادگاری و همکاران (45) در گیاه سویا مطابقت دارد.

کربوهیدرات کل: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر متقابل تیمار × زمان بر روی میزان کربوهیدرات در سطح احتمال یک درصد معنی دار می باشد (جدول 4). نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان می دهد میوه های شاهد در هفته اول آزمایش دارای بیشترین میزان کربوهیدرات می باشند که با تیمار شاهد و تیمار

یکی از فاکتورهای مهم در تعیین رسیدگی در زمان برداشت کسر رسیدگی یا شاخص طعم می باشد که هر کدام از آن ها به تنهایی کیفیت میوه را بهتر نشان می دهد (19). طبق گزارش سونگ و همکاران (36) بالاترین شاخص طعم در طول دوره انبارداری، در تیمار شاهد بود که با نتایج ما همخوانی دارد.

پروتئین کل: نتایج تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر ساده زمان نگهداری در خصوص میزان پروتئین در سطح احتمال پنج درصد معنی دار می باشد (جدول 4). نتایج مقایسه میانگین نشان می دهد که میزان پروتئین در شروع آزمایش بیش از سایر زمان های نگهداری بوده و مقدار آن کاهش یافته است و در هفته دوم و سوم و چهارم

پس از برداشت سالیسیلیک اسید در هفته سوم آزمایش اختلاف معنی داری ندارند (شکل 6).

جدول 4- تجزیه واریانس اثرات اسید سالیسیلیک روی پروتئین، کربوهیدرات و پرولین میوه گوجه فرنگی گیلاسی در طی زمان
Table 4- Analysis of variance effects of salicylic acid on the attributes of proteins, carbohydrates and proline cherry tomato fruit over time.

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات Mean square		
		پروتئین Protein	کربوهیدرات Carbohydrate	پرولین Proline
تیمار Treatment	3	0.00014 ^{ns}	0.07*	0.0001**
زمان Time	5	0.0011*	1.73**	0.00008**
تیمار×زمان Treatment×Time	15	0.00030 ^{ns}	0.12**	0.00002 ^{ns}
اشتباه آزمایشی (Error)	44	0.00044	0.031	0.00002
ضریب تغییرات CV (%)		2.11	1.51	4.60

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطوح 5 و 1 درصد احتمال

ns, * and **: non-significant and significant at 5 and 1 % levels of probability, respectively.

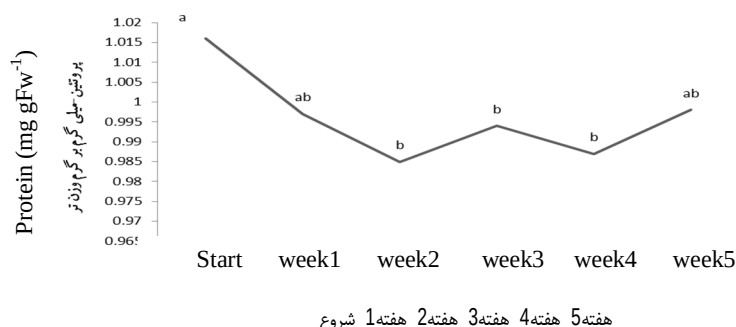
ادامه جدول 4- تجزیه واریانس اثرات اسید سالیسیلیک روی صفات گایاکول پراکسیداز، هیدروژن پراکسید و مالون دی آلدهید میوه گوجه فرنگی گیلاسی در طی زمان

Continued table 4- Analysis of variance effects of salicylic acid on characteristics guaiacol peroxidase, hydrogen peroxide, Malondialdehyd(MDA) cherry tomato fruit over time

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات Mean of Square		
		هیدروژن پراکسید H ₂ O ₂ (Hydrogen peroxide)	گایاکول پراکسیداز GPX (Guaiacol peroxidase)	مالون دی آلدهید MDA (Malondialdehyd)
تیمار Treatment	3	0.00066 ^{ns}	0.0017*	129.74*
زمان Time	5	0.0010*	0.0044**	637.94**
تیمار×زمان Treatment×Time	15	0.00039 ^{ns}	0.0010 ^{ns}	71.43 ^{ns}
اشتباه آزمایشی (Error)	44	0.0005	0.0007	93.17
ضریب تغییرات CV (%)		30.38	0.027	12.02

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطوح 5 و 1 درصد احتمال

ns, * and **: non-significant and significant at 5 and 1 % levels of probability, respectively.

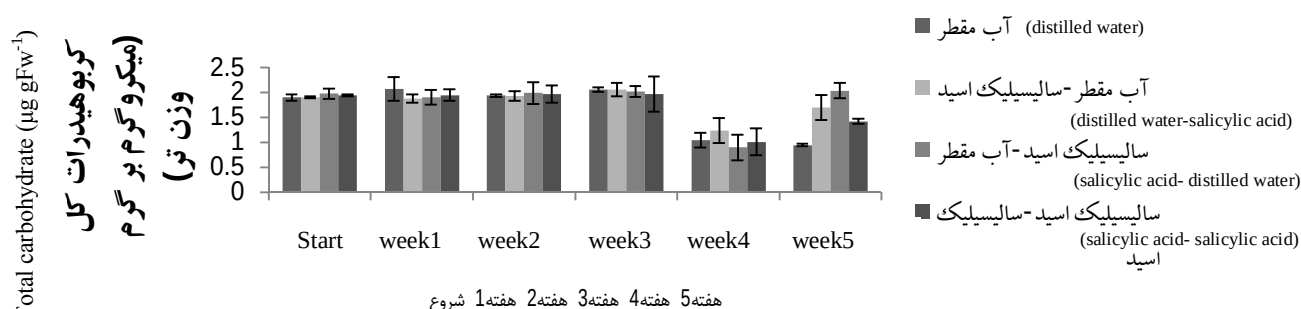


شکل 5- اثر زمان بر میزان پروتئین میوه گوجه فرنگی گیلاسی

حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند

Figure 5- Effect of Time on protein content of cherry tomato fruit

Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test



شکل 6- برهمکنش تیمار سالیسیلیک اسید × زمان بر میزان کربوهیدرات میوه گوجه فرنگی گیلاسی

بارهای روی ستون‌ها نشان دهنده انحراف معیار میانگین‌ها هستند

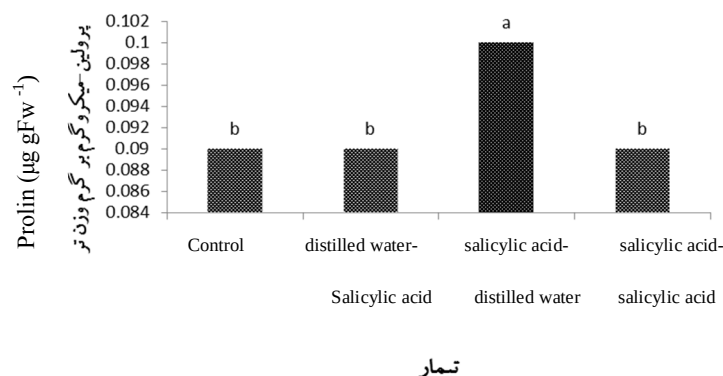
Figure6- interaction effects of salicylic acid × time on the carbohydrate content of cherry tomato fruit

Bars in column indicate standard error of means

انگور مطابقت دارد. از آنجایی که سالیسیلیک اسید به طور طبیعی داخل گیاه ساخته می‌شود با محلول پاشی مقدار سالیسیلیک اسید درونی افزایش پیدا کرده و موجب بهبود مقاومت گیاه در برابر تنش می‌شود.

پرویلین: نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 4) نشان می‌دهد که اثر تیمار ساده سالیسیلیک اسید و زمان نگهداری در خصوص میزان پرویلین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است و میوه‌هایی که قبل برداشت سالیسیلیک اسید دریافت کرده‌اند دارای بیشترین میزان پرویلین بوده‌اند. سایر تیمارها با یکدیگر و نیز تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند (شکل 7).

تیمار سالیسیلیک اسید سیستم آنزیمی هیدرولیزکننده پلی ساکاریدها را مهار کرده و تبدیل قندهای نامحلول به قندهای محلول را کاهش می‌دهد. سالیسیلیک اسید با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده پلی ساکاریدها می‌تواند منجر به افزایش مقدار قندها شده و یا تشکیل قندهای محلول از پلی ساکاریدها را تسریع کند (20). نتایج بدست آمده از شاخص سرمزدگی، کربوهیدرات و میزان پرویلین حاکی از آن است که تیمار قبل از برداشت سالیسیلیک اسید توانسته آسیب سرما و کیفیت میوه‌ها را نسبت به میوه‌های شاهد و میوه‌هایی که قبل از برداشت تیماری دریافت نکرده‌اند، بهبود بخشد که با نتایج فرزانه و همکاران (13) در محلول پاشی گیاه بادمجان با سالیسیلیک اسید و ارشادی و همکاران (11)، محلول پاشی بوته‌های



شکل 7- اثر سالیسیلیک اسید بر میزان پرولین میوه گوجه فرنگی گیلاسی

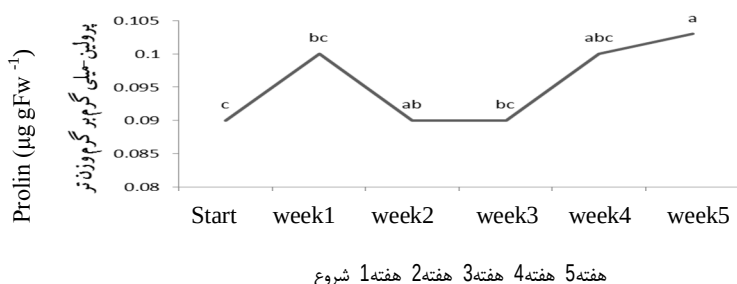
حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند

Figure 7- The effect of salicylic acid on proline content of cherry tomato fruit

Means followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) based on Duncan's multiple range test

همکاران (38) در نهال خیار و فرزانه و همکاران (13) در گیاه بادمجان مطابقت دارد.

میزان پرولین در طی زمان نیز روند صعودی داشت (شکل 8) که با نتایج سلیمانی اقدم و همکاران (37) در گوجه فرنگی و سیاری و



شکل 8- اثر زمان بر میزان پرولین میوه گوجه فرنگی گیلاسی

حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند

Figure 8- Effect time on proline cherry tomato fruit

Means followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) based on Duncan's multiple range test.

میدهد که اثر تیمار ساده سالیسیلیک اسید و زمان نگهداری در خصوص میزان گایاکول پراکسیداز میوه ها به ترتیب در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد معنی دار می باشد (جدول 4). نتایج مقایسه میانگین نشان می دهد میوه های گوجه فرنگی که در پیش و پس از برداشت با سالیسیلیک اسید تیمار شده اند اختلاف معنی داری با میوه های شاهد داشتند و دارای گایاکول پراکسیداز بیشتری نسبت به سایر تیمارها، می باشند (شکل 9).

میزان گایاکول پراکسیداز در طی زمان نگهداری در هفته سوم آزمایش اختلاف معنی داری با سایر زمان ها داشت (شکل 10) که با نتایج آواد (3) و تارین و همکاران (40) در هلو مطابقت دارد.

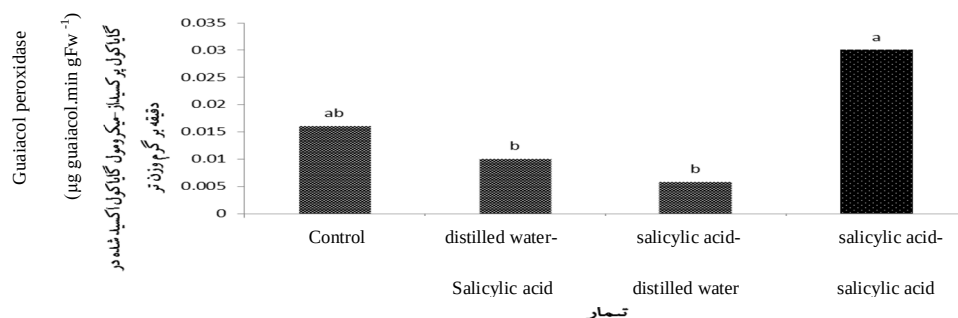
ایجاد خسارت در غشاهای زیستی به دلیل افزایش اکسیژن فعال و رادیکال های آزاد در طی فرآیند رسیدن میوه ها در اثر تنفس سلولی و متابولیسم اکسیداتیو در میوه ها به خصوص میوه های

زمانی که گیاه در معرض تنش سرما قرار می گیرد پرولین تجمع می یابد که نقش مهمی در تنظیم اسمز سلولی بین سیتوپلاسم و واکوئل، سمیت زدایی رادیکال های آزاد و حفظ انسجام غشای سلولی دارد (45). در اثر تخریب آنزیم پروتئین سنتتاز تبدیل پرولین به پروتئین کاهش می یابد و منجر به افزایش پرولین می شود (4). چنین به نظر می رسد که محلول پاشی با 0/75 میلی مولار سالیسیلیک اسید قبل از برداشت، تأثیر بیشتری در انباشته شدن پرولین و نیز ایجاد مقاومت در گیاه داشتند به طوریکه چنین میوه هایی دارای کمترین درصد سرمازدگی بودند که با مقادیر زیاد پرولین در آنها همخوانی دارد. از طرف دیگر بیشترین میزان تجمع پرولین در هفته پنجم می باشد که با افزایش زمان قرار گرفتن میوه ها در دمای پایین چنین نتیجه ای قابل پیش بینی می باشد.

گایاکول پراکسیداز: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان

نشان دهنده تأثیر مثبت سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز می‌باشد به طوری تیمار که پیش و پس از برداشت سالیسیلیک اسید میزان فعالیت آنزیم را افزایش داده و در هفته سوم آزمایش در بالاترین میزان خود می‌باشد و در هفته های چهارم و پنجم که شدت تنش افزایش یافته، فعالیت آنزیم کاهش یافته است.

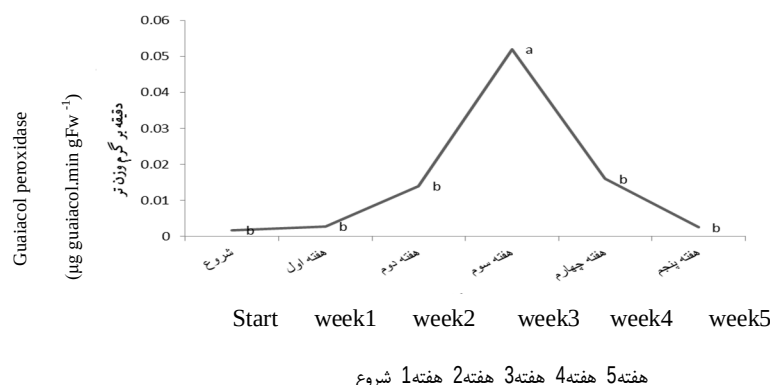
فرازگرا، ایجاد می‌شود. سالیسیلیک اسید به طور مستقیم یا غیر مستقیم با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان موجب پاکسازی رادیکال های آزاد اکسیژن ایجاد شده در اثر تنش می‌شود. پراکسیدازها از جمله آنزیم هایی هستند که نقش زیادی در پاسخ به تنش های غیر زیستی مثل خشکی و سرما دارند. نتایج این پژوهش



شکل 9- اثر سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در میوه گوجه‌فرنگی گیلاسی

حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند

Figure 9- Effects of salicylic acid on the enzyme activity of guaiacol peroxidase of cherry tomato fruit
Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test



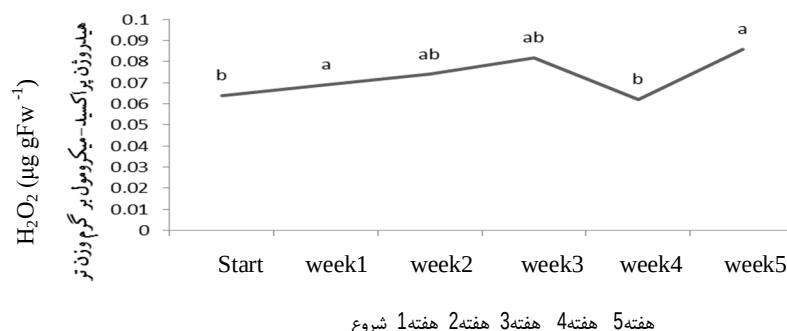
شکل 10- اثر زمان بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز میوه گوجه‌فرنگی گیلاسی

حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند

Figure 10- Effect of Time on enzyme activity of guaiacol peroxidase of cherry tomato fruit
Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test

سبب تولید رادیکال هیدروکسیل (رادیکال آزاد فعال و بسیار مخرب) شود که سطح هیدروژن پراکسید در گیاه تحت تنش سرمازدگی از اهمیت زیادی برخوردار است (8). احتمالاً افزایش مقدار هیدروژن پراکسید در میوه گوجه‌فرنگی گیلاسی به موازات زمان انبارمانی به دلیل تنش وارد شده و آسیب به غشاهای سلولی و اندامک های مختلف سلولی باشد که منجر به تولید پراکسید هیدروژن شده است

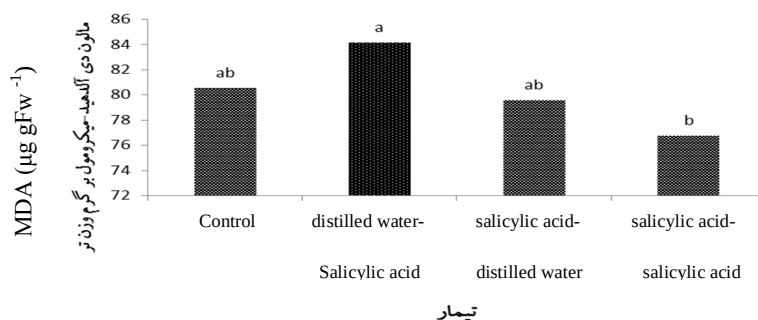
هیدروژن پراکسید (H_2O_2): نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر ساده زمان نگهداری بر روی میزان هیدروژن پراکسید در سطح احتمال پنج درصد معنی دار می‌باشد (جدول 4). با توجه به نتایج مقایسه میانگین میزان هیدروژن پراکسید در طی زمان نگهداری روند صعودی داشت و در هفته چهارم کاهش داشته است (شکل 13). هیدروژن پراکسید علاوه بر اثر سمی و مخرب، می‌تواند



شکل 11- اثر زمان بر میزان هیدروژن پراکسید میوه گوجه فرنگی گیلاسی
حروف همنام اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند
Figure 11-Effect of time on hydrogen peroxide content of cherry tomato fruit
Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$) based on Duncan's multiple range test

گیلاسی که پس از برداشت با سالیسیلیک اسید تیمار شده‌اند، میزان مالون دی آلدئید آن‌ها اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارند (شکل 13).

مالون دی آلدئید: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر تیمار ساده سالیسیلیک اسید و زمان نگهداری به ترتیب در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول 4). نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد که میوه‌های گوجه فرنگی



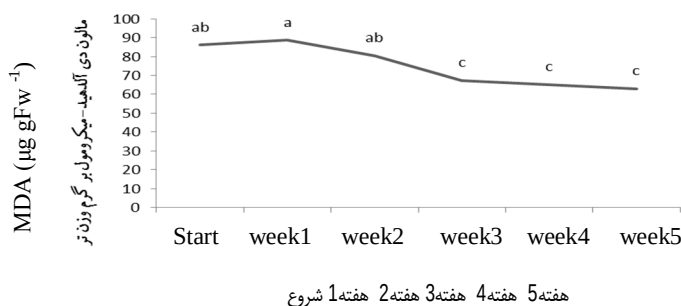
شکل 12- اثر سالیسیلیک اسید بر میزان مالون دی آلدئید میوه گوجه فرنگی گیلاسی
حروف همنام اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ندارند
Figure 12- Effects of salicylic acid on malondialdehyde content of cherry tomato fruit
Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$) based on Duncan's multiple range test

کاهش سرمازدگی، پوسیدگی و میزان مالون دی آلدئید در میوه هلو شده بود (43). از عوامل مهم در مقاومت محصولات باغی در برابر تنش سرما، حفظ انسجام غشای سلولی در دمای پایین است (44). از عواملی که به عنوان شاخص‌های آسیب‌شناسی به منظور اندازه‌گیری غیر مستقیم انسجام غشای سلولی مورد توجه قرار گرفته است، نشت یونی و میزان مالون دی آلدئید است که می‌توانند کاهش انسجام غشای سلولی و وقوع سرمازدگی را در محصولات باغی نشان دهند (36). در تنش سرمازدگی تجمع مالون دی آلدئید به دنبال پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی موجب ایجاد آسیب

در طی زمان نگهداری میزان مالون دی آلدئید در هفته سوم آزمایش کاهش یافت (شکل 12). همانطور که در مقدار مالون دی آلدئید تولید شده در میوه‌ها، مشاهده می‌شود که کمترین تنش وارد شده به میوه‌هایی بوده که با 0/75 میلی مولار سالیسیلیک اسید در مرحله پس از برداشت تیمار شده‌اند و در طی زمان نگهداری میزان تولید مالون دی آلدئید کاهش یافته است که نشان‌دهنده پایداری غشا و جلوگیری از تنش می‌باشد که نتایج ما با یافته‌های سلیمانی اقدام و همکاران (38) در گوجه فرنگی مطابقت دارد. سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی مولار موجب حفظ سفتی و

گونه های فعال اکسیژن به وجود می آید و می تواند به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی مورد توجه قرار گیرد (14).

در محصولات شده و بکارگیری سالیسیلیک اسید با کاهش تجمع مالون دی آلدید می تواند آسیب سرمازدگی را کاهش دهد (4). محصول نهایی اسیدهای چرب مالون دی آلدید است که در اثر تولید



شکل 13- اثر زمان بر میزان مالون دی آلدید میوه گوجه فرنگی گیلاسی

حروف همنام اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن ندارند

Figure 13-Effect of time on malonide aldehyde content f cherry tomato fruit

Means followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

سرمازدگی در میوه گوجه فرنگی گیلاسی مورد استفاده قرار بگیرد. در نهایت در این پژوهش نشان داده شد که استفاده از 0/75 میلی مولار سالیسیلیک اسید توانسته درصد آسیب سرمازدگی میوه های گوجه فرنگی گیلاسی را در طی نگهداری در دمای یک درجه سانتی گراد کاهش دهد به طوری که بیشترین میزان آسیب در میوه های شاهد (آب مقطر) و کمترین آن در میوه های تیمار شده با سالیسیلیک اسید بود. همچنین نتایج حاصل از درصد آسیب سرمازدگی، میزان پرولین، کربوهیدرات و شاخص های مربوط به کیفیت میوه گوجه فرنگی گیلاسی نشان داد تیمار اسید سالیسیلیک می تواند روی تحمل به سرمازدگی در طی انبارداری موثر باشد. در مقایسه با شاهد تیمارهای قبل از برداشت بیشترین اثر را در پایداری گوجه فرنگی گیلاسی به سرمازدگی داشتند همچنین با افزایش دفعات کاربرد اسید سالیسیلیک اثرگذاری این تیمار کم شد. به نظر می رسد استفاده از تیمار پیش از برداشت نقش مهم تری در القا مکانیسم های مقاومت به گیاهان دارد ولی برای اعلام نظر قطعی بدیهی است که پژوهش های بیشتری باید انجام گیرد.

نتیجه گیری کلی

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تیمار پیش و پس از برداشت 0/75 میلی مولار سالیسیلیک اسید به منظور کاهش آسیب سرمازدگی میوه گوجه فرنگی گیلاسی انجام گرفت. طی این پژوهش، صفات مورفولوژیکی از جمله آسیب سرمازدگی، درصد کاهش وزن، شاخص طعم، مواد جامد محلول، اسیدیته قابل تیتراسیون و صفات بیوشیمیایی از جمله میزان پرولین، مالون دی آلدید، پروتئین، پراکسید هیدروژن، کربوهیدرات کل و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم گایاکول پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. سالیسیلیک اسید به عنوان یک ترکیب فنولی طبیعی می تواند آسیب های اکسیداتیو ناشی از سرمازدگی را کاهش داده و از انباشت مالون دی آلدید جلوگیری می کند و بنابراین به عنوان جایگزین مناسب برای مواد شیمیایی که در صنعت انبارداری استفاده می شود، به کار می رود. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش می توان بیان کرد که سالیسیلیک اسید با غلظت 0/75 میلی مولار، تیمار مؤثری جهت حفظ ویژگی های کمی و کیفی گوجه فرنگی گیلاسی و کنترل آسیب سرمازدگی است و می تواند به عنوان یک تکنولوژی توانمند برای کاهش آسیب

منابع

- 1- Aghaei K., Shekari F., and Alimadad A. 2014. The effect of salicylic acid priming on flowering and quality of tomato under drought stress. 2th national congress on medicinal plant and sustained agriculture. 1-14 (in persian)
- 2- Hafeznia M., Mashayekhi K., and Ghaderifar F. 2013. The effect of salicylic acid during different stages of tomato growth and investigation of quanti and quality traits of the plant. MS.c Thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Faculty of Agriculture and Natural Resources (in Persian)
- 3- Awad R.M. 2013. Effect of postharvest salicylic acid treatments on fruit quality of peach cv. "Flordaprince" during cold storage. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 7: 920-927.
- 4- Asgharia M.R., and Aghdam M.S. 2010. Impact of salicylic acid on postharvest physiology of horticultural

- crops. Trends in Food Science and Technology. 21:502-509.
- 5- Ashraf M., and Foolad M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress esistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
- 6- Bradford M.M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem, 72: 248-254.
- 7- Cag S., Cevahir-Oz G., Sarsag M., and Goren S.N. 2009. Effect of salicylic acid on pigment, protein content and peroxidase activity in excised sun flower cotyledons. Pak. Journal of Botany, 41: 2297-2303.
- 8- Chen Y.Z., and Patterson B.D. 1988. The Effect of Chilling Temperature on the Level of Superoxide Dismutase, Catalase and Hydrogen Peroxide in Some Plant Leaves. Acta Phytophysiology Science, 14:8-323.
- 9- Ding C.K., Wang C.Y., Gross K.C., and Smith D.L. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta, 214:895-901.
- 10- Ding Z.S., Tian S.P., Zheng X.L., Zhou Z.W., and Xu, Y. 2007. Responses of reactive oxygen metabolism and qualityin mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. Physiology Plant, 130: 112-121.
- 11- Ershadi A. and Taheri S. 2013. Investigion salicylic acid treatment on spring tolerance to freezing grapes (*VitisVinifera*) white seedless varieties. To farmers, 15(2); 146-135.
- 12- Ebrahimzadeh M., Aboutalebi S., Kamelmanesh M.M., and Kavand A. 2012. Effect of salicylic acid on chilling injury and some quantitative and qualitative characteristics Kinnow (*Citrus reticulata* Blanco. Cv.Kinnow). Journal of Physiology and post-harvest technology products horticultural, 1 (1): 29-13.
- 13- Farzaneh M., Ghanbari M., Eftekharian Jahromi A., and Javanmardi SH. 2013. The effect of foliar application of salicylic acid on photosynthetic pigments Osmolytes and eggplant (*Solanum melongenal* L.). Journal of plant physiological Iran, 32(4): 83-75.
- 14- Hodges D., Delong J.M., Forney C.F., and Prange R.K. 1999. Improving the thio barbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207: 604-611.
- 15- Huang Y.F., Chen C.T., and Kao C.H. 1993. Salicylic acid inhibits the biosynthesis of ethylene in detached rice leaves. Plant Growth Reglature, 12: 79-82.
- 16- Hasandokht M. 2012. Vegetable production technology. Publications series. 493pp.
- 17- Irigoyen J.J., Emerich D.W., and Sanchez D.M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*). Plants Physiology Plantarum, 84: 55-60.
- 18- Kang G., and Wang C.H. 2003. Salicylic acid changes activites of H_2O_2 metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environmental and Experimental Botany, 42: 9-50.
- 19- Kader A., Heintz C., and Chordas A. 1982. Postharvest quality of fresh and canned clingstone Peaches as influenced by genotypes and maturity at harvest. Journal of the American Society for Horticulture Science, 107: 947- 951.
- 20- Khodary S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. International Journal Agriculture and Biology, 6: 5-8.
- 21- Lau O.L., Liu Y., and Yanh S.F. 1986. Effect of fruit detachment on ethylene ebio synthesis, and loss of flesh firmness skin color, and starch in ripening 'Golden delicious' apples. Journal of the American Society for Horticulture Science, 111: 731-734.
- 22- Lyons J.M. 1973. Chilling injury in plants. Ann. Reviwe. Plant Physiology, 24: 445-466.
- 23- Morris L.L. 1982. Chilling injury of horticultural crops an overview. Horticulture Science, 17: 161-162.
- 24- Murbach C.M., Arquesand M.O., and Coast M. 2006. Effects of sesonalvariation on the central nervosa system activity of Cimumgratissimuml L. essential oil. Journal of Ethno pharmacola, 105: 161-166.
- 25- Peyvast G. 2005. Olericulture. Publications possible knowledge. 487pp
- 26- Raison J.K. and Lyons J.M. 1986. Chilling injury aplea for uniform terminology. Plant Cell Environ, 9: 685-686.
- 27- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annu. Reviwe. Plant Physiology Plant Mol. Biology, 43:439-463.
- 28- Rohi Z., Asghari M., Rasmi Y., and Aslani Z. 2010. Effect of salicylic acid on postharvest quality characteristics and antioxidant activity of kiwifruit cultivars Howard. Journal of Horticultural Science (Sciences Agriculture industry), 42(1): 108-102.
- 29- Rabii V., and Rahmani S. 2014. Effect of salicylic acid, calcium chloride and heat water treatments based on quantitative parameters, quality and shelf-life, sweet-and-sour pomegranate varieties. College of Horticulture, 28(1): 115-107.
- 30- Rasteghari H., Tehranfar A., Nemati S.H., and Vazifeh Shenan M.R. 2014. Salicylic acid to harvest pomegranate fruit characteristics and post-harvest cold storage. Journal of Horticultural Science (Agricultural Science and Technology), 28 (3): 368-360.
- 31- Senaratna T., Touchell D., Bunn E., and Dixon K. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plant. Plant Growth Regulature, 30:157-161.
- 32- Sayyari M. 2009. Improving Chilling Resistance of Cucumber Seedlings by Salicylic Acid. American-Eurasian

- Journal. Agriculture and Environmental Sciences, 12: 204-209.
- 33- Srivastava M.K., and Dwivedi U.N. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. Plant Science, 158: 87-96.
 - 34- Sergiv I., Alexieva V., and Karanov E. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Acad Bulg Science, 51: 121-124
 - 35- Stewart R.R.C., and Bewley J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant physiology, 65: 245-248.
 - 36- Seung K., and Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20(3):207-220.
 - 37- Soleimani Aghdam M., Asghari M., Khorsandi A., Muradbeygi H., Mohamadkhani N., Mohayjei M., and Hassanpor aghdam, M.B. 2014. Possible mechanisms of salicylic acid to reduce the effects of frost after harvest tomato fruit. Journal of plant research (Journal of Biology Iran), 27(2): 34-46.
 - 38- Sayyari M., Babalar M., and Kalantari S. 2011. Effect of salicylic acid of increased resistance to chilling injuri, antioxidant activity and quality of pomegranate cv. Rabab cold during storage. Iranian Horticultural Science Journal, 42(4): 247-339.
 - 39- Shang H., Cao S., Yang Z., Cai Y., and Zheng Y. 2011. Effect of exogenous γ -Aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. Journal of Agriculture Food Chemistry, 59: 1264-1268.
 - 40- Tareen M.J., Abbasi A.N., and Ahmad hafiz I. 2010. Effect of Salicylic acid Treatments on Storage Life of Peach Fruit cv.Flordaking .Chapter 3. 97-206.
 - 41- Wang C.Y. 1994. Chilling injury in horticultural commodities.HortScience,U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705-2350.
 - 42- Wang L., Chen S., Kong W., Li S., and Archbold D.D. 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and effects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. Postharvest Biology and Technology, 41: 244-251.
 - 43- Wonsheree T., Kesta S., and Vandoorn W.G. 2009 .The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimumcitriodourum*) leaves. Postharvest Biology and Technology, 51: 91-96.
 - 44- ZeinaliYadegari L., Heidari R., and Carapetian J. 2007. The Tnfluence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments in soybean (*glycine max*) seedlings. Journal of Biological Sciences, 7: 1436-1441.
 - 45- Zhang Y., Chen K., Zhang S., and Ferguson I. 2003. The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwi fruit.Post harvest Biology and Technology, 28: 67-74.
 - 46- Zhao D.Y., Shen L., Fan B., Liu K.L., Yu M.M., Zheng Y., Ding Y., and Sheng J.P. 2009. Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. Journal of Agriculture Food Chemistry, 74: 348-352.



Effect of Salicylic Acid on Prevention of Chilling Injury of Cherry Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Messina)

H. Seyed Hajizadeh^{1*} - Sh. Safkhani²

Received: 30-11-2015

Accepted: 26-02-2017

Introduction: Fruits and vegetables play a major role in providing vitamins and minerals that are essential in the metabolism. In addition to providing vitamins and minerals compounds, they are called secondary metabolites. Tomatoes are one of the most vegetables in diets of people around the world. Low temperature stress associated with the production of reactive oxygen species causing damage can occur before or after harvest, farm, transportation, storage and marketing. Today, a greater emphasis is placed on post-harvest storage of agricultural products to increase productivity and make better use of labor resources, worker, energy and money, rather than an increase in production. One of the most promising treatments is the use of salicylic acid for prevention of the frost damage of post-harvest fruits and vegetables with different mechanisms such as increased enzymatic and non-enzymatic antioxidant system activity. Salicylic acid is known as a signal molecule in the induction defense mechanisms in plants. SA is a well-known phenol that can prevent ACO activity that is the direct precursor of ethylene and decreases Reactive Oxygen Species (ROS) with increasing enzyme antioxidant activity. Salicylic acid is a natural phenolic compound known as a plant hormone having positive effect on storage life and quality of fruits. This study aimed to investigate the effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid on antioxidant properties and quality of tomato and its effect was evaluated on prevention of chilling injury of cherry tomatoes during cold storage.

Material and Methods: This research was conducted in a greenhouse of Horticulture Department of University of Maragheh. Treatments were included before harvest at fruit set stage with the control (distilled water) and 0.75 mM salicylic acid spraying and after harvest, red ripened fruits were used for treatments control and immersion in 0.75 mM salicylic acid. Then all the treated fruits were transferred to 1 °C. Sampling of fruits was done weekly and continued five weeks. In the last week of the experiment, fruits were kept for three days at room temperature (24-25 °C) to evaluate the effects of frost on the whole period. To determine the effect of salicylic acid on percentage of cherry tomatoes injury, analysis of variance for a completely randomized design with three replications was used. For other traits factorial experiment with completely randomized design was applied. The treatments included salicylic acid treatment and six periods of storage. Duncan test was used for comparison of means.

Results and discussions: The results showed that the effect of salicylic acid significantly reduced frost damage in cherry tomato fruits during the storage period ($P \leq 0/01$). Treated fruit with salicylic acid before harvest showed the lowest damage of chilling in comparison with controls. Titratable acidity is directly related to the concentration of organic acids present in the fruit which is an important parameter in maintaining the quality of fruits. Titratable acidity increased gradually in all treatments except control and it seems to be influenced by the postharvest SA. Cell membrane of injured tissue was exposed to transform from a crystal liquid phase to a solid gel together and thus membrane permeability and ion membrane leak were increased (Wang *et al.*, 2006). Salicylic acid may be used in the pre-harvest cherry tomatoes had a large role in the stability of the membrane and prevention of chilling injury. Salicylic acid was used before conception and chilling injury (Wang *et al.*, 2006). Salicylic acid may be used in the pre-harvest cherry tomatoes that had a large role in the stability of the membrane and prevention of chilling injury. Application of salicylic acid before harvest on cherry tomatoes was more effective in maintaining the quality of the fruit and preventing of chilling injury. Organic acids reduce the consumption of sugars that occur during breathing and are directly related to metabolic activities (Jalili Marandi, 1383; Rahemi, 1384). It seems that spraying with 0.75 mM salicylic acid before conception, had a greater impact on the accumulation of proline and resistance in the plants and so the fruit had the lowest percentage of frost and high levels of proline matches. The maximum amount of proline in fruits at low temperature was obtained by increasing the exposure time after fifth week.

1 and 2- Associate Professor and MS.c. Geaduated student of Departement of Horticultural Sciences and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh
(* - Corresponding Author Email: hajizade@maragheh.ac.ir)

Conclusion: The results of the percentage of chilling injury, proline, carbohydrate and indicators related to quality of tomato fruits cherry tomato showed that treatment with salicylic acid can be effective on chilling tolerance during storage. Compared with the control treatments before harvesting frost cherry tomato had the greatest influence on stability by increasing the number of applications of salicylic acid that also reduced the effectiveness of this treatment.

Keywords: Cold stress, Cherry tomato, Storage life and Fruit quality



تأثیر تاریخ کاشت بر عملکرد و تجمع نیترات اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) در شرایط آب و هوایی اصفهان

پیمان جعفری^{*1} - امیر هوشنگ جلالی²

تاریخ دریافت: 1395/03/12

تاریخ پذیرش: 1395/12/10

چکیده

به منظور بررسی تاریخ کاشت‌های مختلف بر عملکرد، اجزای عملکرد و تجمع نیترات در اسفناج، پژوهشی دو ساله (1394-1393) در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انجام شد. بر اساس نتایج تجزیه مرکب داده‌ها تأثیر سال بر صفات آزمایشی معنی‌دار نبود و تاریخ کاشت 15 شهریور (GDD=571) با عملکرد 43 تن در هکتار بهترین تاریخ کاشت اسفناج تشخیص داده شد. با تأخیر تاریخ کاشت از 15 شهریور تا اول آبان علاوه بر کاهش معنی‌دار عملکرد، مقدار تجمع نیترات در گیاه به طور خطی افزایش یافت. مقادیر تجمع نیترات در تاریخ کاشت‌های 15 شهریور (GDD=571)، اول مهر (GDD=354)، 15 مهر (GDD=193) و اول آبان (GDD=84) به ترتیب برابر بود با 2675، 2898، 3189 و 3571 قسمت در میلیون وزن تر. در تاریخ کاشت‌های مختلف، تجمع نیترات در دمبرگ دامنه‌ای از 3513 تا 4680 قسمت در میلیون وزن تر و در پهنک برگ دامنه‌ای از 2135 تا 3125 قسمت در میلیون وزن تر داشت. با توجه به نتایج این پژوهش رعایت نکردن تاریخ کاشت مناسب نه تنها عملکرد اسفناج را کاهش خواهد داد بلکه با افزایش تجمع نیترات (بیش از 2500 قسمت در میلیون وزن تر) باعث مخاطراتی برای مصرف کنندگان خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: ارتفاع بوته، تعداد برگ، درجه-روز - رشد (GDD = Growth Degree Day)، دمبرگ

مقدمه

تاریخ کاشت تأثیر به سزایی در تولید کمی و کیفی محصول اسفناج داشته و در صورت عدم رعایت تاریخ کاشت مناسب و مواجه شدن طول دوره رشد گیاه با دماهای بالا (30 تا 35 درجه سانتی گراد) و همچنین کم آبی، عملکرد (از نظر کمی و کیفی) به شدت نقصان می‌یابد (21). دماهای بالا و کم آبی در شرایط کشت‌های بهاره بیشتر محتمل بوده در حالی که در تاریخ کشت‌های پاییزه که معمولاً عملکردهای بالاتری نسبت به کشت‌های بهاره نیز دارند (13) تأخیر در تاریخ کاشت اسفناج (غالباً بعد از نیمه مهر ماه) به عنوان عامل محدود کننده مطرح است (19). تعداد برگ مهم ترین جزء عملکرد در اسفناج است که تحت تأثیر تاریخ کاشت قرار گرفته (3) و در صورت انتخاب تاریخ کاشت‌های مناسب عملکردهای حدود 45 تن در هکتار نیز دور از انتظار نیست (17).

در زمین‌های غنی از نیتروژن، شرایط کمی نور و استفاده زیاد از کودهای شیمیایی نیتروژن دار، گیاهانی با طول فصل رویش کوتاه مثل اسفناج، با مشکل تجمع نیترات مواجه می‌شوند (16)، بنابراین تاریخ کاشت با تأثیر بر هر یک از عوامل تولید (دما، نور و...) می‌تواند بر کمیت و کیفیت اسفناج تولیدی تأثیرگذار باشد. دامنه‌ی مجاز نیترات بر اساس وزن تر برای اسفناج 345 تا 3890 میلی گرم بر کیلوگرم است که عمدتاً در برگ‌های وسط بوته تجمع می‌یابد (14)،

مصرف اسفناج به صورت تازه خوری، بخار پز و جوشانده از یک سو به دلیل داشتن ترکیبات آنتی اکسیدان دارای ارزش زیستی زیادی است و از سوی دیگر استفاده از این گیاه غنی از نیترات در حد متعارف می‌تواند نقش مهمی در کاهش حملات قلبی ایفا نماید (12). در ایران سالیانه بیش از 30 درصد از سطح زیر کشت سبزیجات برگی به کشت اسفناج اختصاص می‌یابد (11). سبزیجات برگی و به ویژه اسفناج از منابع اصلی جذب نیترات محسوب شده و حدود 70 درصد از کل نیترات جذب شده در رژیم غذایی هر فرد در روز از طریق سبزیجات برگی تأمین می‌گردد (22).

1- مربی پژوهش، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

(* - نویسنده مسئول: Email: peimanjafari@yahoo.com)

2- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات علوم زراعی-باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

به هر حال میزان تجمع نیترات در سبزی‌ها بسته به گونه، رقم و حتی تفاوت‌های ژنوتیپی خاص مانند سطح پلوییدی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (1).

با توجه به مصرف اندام‌های رویشی در سبزیجاتی مثل اسفناج، شرایط اقلیمی تأثیر گذار بر کمیت و کیفیت محصول از اهمیت ویژه برخوردار است. در این رابطه تاریخ کاشت علاوه بر عملکرد می‌تواند بر مقدار تجمع نیترات در گیاه تأثیر گذاشته و این مطلب کمتر در پژوهش‌ها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر پنج تاریخ کاشت مختلف (پنج تاریخ کاشت از اول مهر با فواصل 15 روز) بر عملکرد، اجزای عملکرد و تجمع نیترات در گیاه اسفناج در شرایط آب و هوایی استان اصفهان بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت دو سال از نیمه شهریور سال 1393 به منظور بررسی تعیین مناسب‌ترین تاریخ کاشت اسفناج بذر خاردار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی کبوترآباد اصفهان واقع در 25 کیلومتری شرق اصفهان با طول جغرافیایی 51 درجه و 51 دقیقه شرقی و عرض

جغرافیای 31 درجه و 32 دقیقه شمالی و ارتفاع از سطح دریا 1545 متر اجرا شد. بر اساس آمار 20 ساله هواشناسی، متوسط بارندگی و دمای سالیانه این ایستگاه به ترتیب برابر 110 میلی متر و 25 درجه سانتی گراد است. برخی ویژگی‌های خاک محل آزمایش در جدول 1 نشان داده شده است.

در هر سال، آزمایش با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد و نتایج دو ساله آزمایش تجزیه مرکب شدند. پنج تاریخ کاشت به فواصل 15 روز از اول شهریور ماه، تیمارهای آزمایشی را تشکیل دادند. اسفناج بذر خاردار حاصل هفت سال گزینش و تلاقی از بذر اسفناج شهر ری است که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. عملیات تهیه زمین شامل شخم و دیسک انجام گرفته و بر اساس آزمون خاک 70 کیلوگرم فسفر خالص به صورت سوپر فسفات تریبل، 100 کیلوگرم پتاسیم خالص به صورت سولفات پتاسیم و 40 کیلوگرم نیتروژن خالص (معادل 80 کیلوگرم اوره) به خاک اضافه شد. 40 کیلوگرم نیتروژن دیگر در مرحله 3-4 برگی به صورت سرک مصرف شد.

جدول 1- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1- Physical and chemical characteristics of the of soil testing

ویژگی Characteristic	مقدار Amount
بافت Texture	لومی Loam
شن Sand (%)	11
سیلت Silt (%)	40
رس (%) Clay	48
هدایت الکتریکی EC(dS m ⁻¹)	3.5
اسیدیته pH	7.9
مواد آلی Organic mater (%)	0.3
فسفر P (mg kg ⁻¹)	12.6
پتاسیم K(mg kg ⁻¹)	228
نیتروژن N (%)	0.075

زیر استفاده شد (20)، که در آن:

$$GDD = \left(\frac{T_{\max} + T_{\min}}{2} \right) - T_b$$

GDD: درجه-روز-رشد

Tmax: بیشینه (حداکثر) روزانه دما

Tmin: کمینه (حداقل) روزانه دما

Tb: دمای پایه می باشد که برای اسفناج 5 درجه سانتیگراد

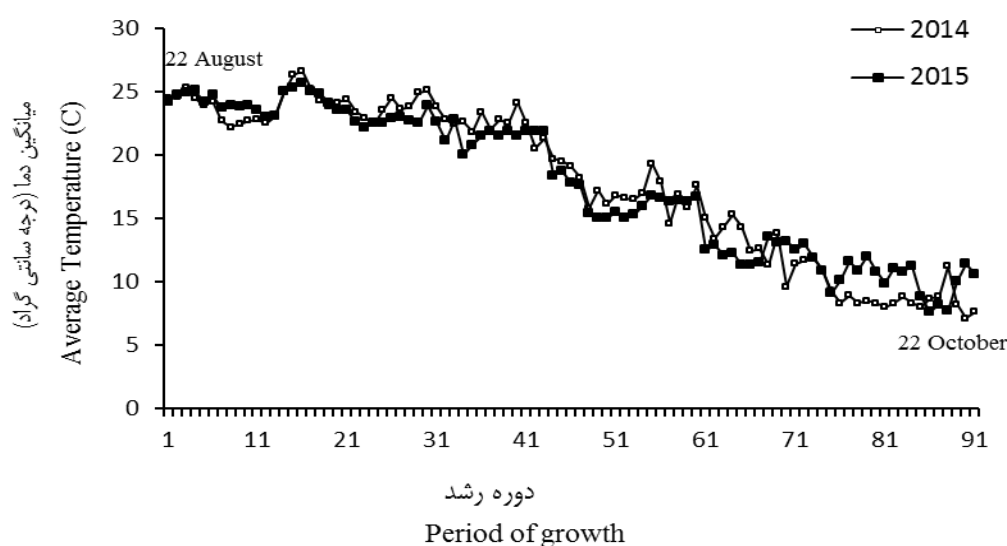
در نظر گرفته شد. تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS

انجام و میانگین ها با روش LSD (پنج درصد) مقایسه گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس مرکب صفات مختلف اسفناج در جدول 2 نشان داده شده است. با توجه به یکسان بودن شرایط در دو سال آزمایش (آبیاری و مراقبت های یکسان) و همچنین فقدان بارندگی موثر در طول دوره رشد، مهمترین عامل اقلیمی که می توانست باعث ایجاد تفاوت در دو سال آزمایش شود، دمای هوا بود. میانگین دما در طول دوره رشد در دو سال پژوهش نوسان قابل ملاحظه ای نداشت (شکل 1)، بنابراین طبیعی بود که تاثیر سال و برهمکنش سال و تاریخ کاشت بر هیچ یک از صفات آزمایشی معنی دار نباشد. تاثیر تاریخ کاشت بر صفات عملکرد، تعداد برگ و مقدار نیترات (در سطح احتمال 5 درصد) و

بذر اسفناج در دو طرف پشته هایی به عرض 60 سانتی متر (دو خط در هر طرف پشته) انجام شد به گونه ای که هر کرت آزمایشی شامل چهار خط کشت با فواصل 30 سانتی متر و طول 5 متر بود. هر پنج کرت با ویژگی های ذکر شده یک تکرار را تشکیل می دادند. فاصله بین کرت ها نیم متر بود و بین تکرارها نیز یک متر در نظر گرفته شد. در هر دو سال برداشت از هر تاریخ کاشت به فاصله 50 روز از زمان کشت صورت گرفت. در دوران رشد و نمو، مراقبت های زراعی لازم همچون سله شکنی و وجین انجام گرفت و آبیاری بر اساس کاهش 50 درصد رطوبت از عمق نفوذ ریشه و از طریق نمونه گیری از خاک کرت های آزمایشی در پای بوته ها و به روش وزنی صورت پذیرفت. در مرحله توسعه کامل برگ و قبل از برداشت محصول از هر کرت 10 بوته به طور تصادفی انتخاب و صفات: تعداد برگ، طول برگ، عرض پهنک برگ و طول دمبرگ اندازه گیری شد. جهت برآورد عملکرد پس از حذف دو فاصله نیم متری از دو طرف خطوط وسط هر کرت، بوته های دو خط (سطحی معادل دو متر مربع) برداشت شد. مقدار نیترات نمونه با استفاده از دستگاه یون آنالایزر (Ion Analyser Jenway 3040, England) بر روی نمونه های کامل بوته (برگ و دمبرگ) محاسبه و ثبت شد. در این روش 0/5 گرم از نمونه خشک گیاهی با 50 میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت 45 دقیقه با دستگاه هم زن با سرعت 180 دور در دقیقه عصاره گیری شده و پس از عبور عصاره از کاغذ صافی با دستگاه یون آنالایزر مقدار نیترات اندازه گیری می شود. برای محاسبه درجه-روز-رشد (GDD= Growth degree day)، از رابطه



شکل 1- تغییرات میانگین روزانه دما در طول دوره رشد

Figure 1- Changes in daily average temperatures during the growing season

جدول 2 - تجزیه واریانس صفات در تاریخ کاشت‌های مختلف اسفناج
Table 2- Analysis of variance of traits in different spinach sowing date

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)						
		عملکرد تازه Fresh yield	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	طول دم‌برگ Petiole length	ارتفاع بوته Plant height	مقدار نیترات NO ₃ ⁻
سال Year (Y)	1	12.60 ^{ns}	15.06 ^{ns}	17.29 ^{ns}	11.70 ^{ns}	10.14 ^{ns}	14.01 ^{ns}	12.66 ^{ns}
خطا Error	4	6.03	2.29	7.70	5.04	4.01	2.06	4.94
تاریخ کاشت (S) date Sowing	4	84.07*	60.00*	22.02**	15.20**	19.41**	11.68**	16.60*
تاریخ کاشت × سال (Y × S)	4	5.60 ^{ns}	6.11 ^{ns}	5.20 ^{ns}	2.13 ^{ns}	1.04 ^{ns}	2.01 ^{ns}	2.06 ^{ns}
خطا Error	16	12.00	9.95	13.10	8.05	7.58	6.64	9.00
ضریب تغییرات CV%		16.01	10.44	11.75	9.12	9.60	15.11	14.64

ns: غیر معنی‌دار، *: معنی دار در سطح احتمال 5 درصد، **: معنی دار در سطح احتمال 1 درصد

ns: Non-significant; * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

برتری عملکرد اسفناج به دلیل تعداد برگ (بیش از 20 برگ) و طول پهنک برگ بیشتر (17/25 سانتی متر) در پژوهش‌های دیگر نیز مورد تأکید قرار گرفته است (3 و 14). تعداد برگ به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل تأثیرگذار بر عملکرد اسفناج با توجه به رقم و شرایط محیطی می‌تواند دچار تغییر شده و در برخی از پژوهش‌ها دامنه‌ای از 12 تا 23 عدد برای آن ذکر شده است (3). به هر حال پس از رسیدن گیاه به یک مرحله نمو مشخص، تعداد برگ ثابت بوده (در این پژوهش 15 شهریور) و از آن پس این ابعاد برگ (طول و عرض پهنک برگ) است که عامل تعیین‌کننده افزایش عملکرد می‌شود. در شرایطی که رشد برگ‌ها با دمای پایین مواجه شود (مشابه شرایط تاریخ کاشت اول مهر، 15 مهر و اول آبان)، برگ‌های اسفناج برای سازش با شرایط موجود ضخامت برگ‌ها را افزایش داده و از گسترش طولی سطح برگ‌ها کاسته می‌شود (5). ارتفاع بوته‌ها به ویژه در تاریخ کشت‌های 15 مهر و اول آبان به طور قابل توجهی کاهش یافت (تقریباً نصف ارتفاع سایر تیمارها) که این امر نه تنها یکی از دلایل افت عملکرد این تیمارها محسوب می‌شود بلکه به عنوان یک صفت نامطلوب از نظر برداشت مکانیزه نیز می‌باشد (18).

رابطه تاریخ کاشت و تجمع نیترات در اسفناج

رابطه غلظت نیترات گیاه و تاریخ کاشت در شکل 2 نشان داده شده است. در تاریخ کاشت اول شهریور ماه مقدار نیترات گیاه (شامل

طول برگ، عرض برگ، طول دم‌برگ و ارتفاع بوته) در سطح احتمال 1 درصد از نظر آماری معنی‌دار بود. مقایسه میانگین مربوط به تأثیر تاریخ کاشت‌های مختلف بر صفات اندازه‌گیری شده در جدول 3 نمایش داده شده است.

تأثیر تاریخ کاشت‌های مختلف بر عملکرد و اجزای عملکرد

عملکرد تازه در تاریخ کاشت 15 شهریور 43/05 تن در هکتار بود که نسبت به سایر تاریخ‌های کشت به طور معنی‌دار (سطح احتمال 5 درصد) عملکرد بالاتری داشت (جدول 3). عملکرد زیاده‌تر در این تاریخ کاشت به دلیل افزایش تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ و ارتفاع بوته در این تاریخ کاشت بود. افزایش عملکرد تاریخ کاشت 15 شهریور نسبت به تاریخ کاشت‌های اول شهریور، اول مهر و اول آبان به ترتیب 1/54، 2/01، 1/64 و 3/67 برابر بیشتر بود. تفاوت معنی‌داری بین عملکرد تاریخ کشت‌های اول شهریور، اول مهر و 15 مهر مشاهده نشد (سطح احتمال 5 درصد) اما تاریخ کشت اول آبان کمترین مقدار عملکرد را داشت. تعداد برگ جزء نسبتاً ثابت تری نسبت به سایر اجزای عملکرد بود و فقط در تاریخ کاشت 15 شهریور نسبت به سایر تاریخ‌های کاشت دیگر افزایش معنی‌دار داشت، دو تاریخ کاشت 15 مهر و اول آبان به ترتیب با ارتفاع بوته‌های 14/2 و 11/37 سانتی متر به طور معنی‌دار ارتفاع کمتری نسبت به سایر تاریخ‌های کاشت داشتند.

طبیعی است که با کاهش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز شرایط برای تجمع نیترات مهیا تر باشد. کیفیت نور دریافت شده توسط گیاه نیز بر تجمع نیترات تاثیر داشته و نور قرمز به دلیل نقش بیشتر در تحریک فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز در کاهش تجمع نیترات بر نور آبی برتری دارد (4). در برخی از پژوهش ها مقدار نور قرمز برای تاثیر بر کاهش تجمع نیترات گیاه، هشت برابر مقدار نور آبی ذکر شده است (24). شاید افزایش نسبت نور آبی به قرمز در کشت های پاییزه نسبت به کشت های بهاره (به دلایل شرایط ابری) نیز یکی از دلایل افزایش بیشتر تجمع نیترات در این تاریخ های کشت نسبت به کشت های بهاره باشد.

برگ و دمبرگ) در حداقل مقدار خود قرار داشت و از این تاریخ تا تاریخ کاشت اول آبان، رابطه ای خطی و معنی دار بین مقدار نیترات و تاریخ کاشت مشاهده شد.

تاریخ کاشت های مختلف می تواند از طریق تاثیر بر طول روز، میزان و شدت نور دریافتی بر میزان نیترات گیاه تاثیر گذارد. عدم تعادل بین جذب نیترات و کاهش آن درون بافت های گیاهی می تواند دلیل افزایش میزان نیترات در سطوح بالاتر از حد مجاز باشد (8) فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز که نقش کاهنده نیترات موجود در اندام های هوایی را داشته با افزایش دما تا 25 درجه افزایش می یابد (5). در پژوهش حاضر با فاصله گرفتن از تاریخ کاشت اول شهریور (به سمت آبان) علاوه بر کاهش نور دریافتی دما نیز کاهش یافته و

جدول 3 - تأثیر تاریخ کاشت های مختلف بر عملکرد تازه، تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ و ارتفاع بوته اسفناج

Table 3 - Effect of sdate owing on fresh yield, leaf number, leaf length, leaf width, and plant height of spinach

تاریخ کاشت Sowing Date	عملکرد تازه Fresh yield (t ha ⁻¹)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length (cm)	عرض برگ Leaf width (cm)	ارتفاع بوته Plant height (cm)
اول شهریور 22 Aug.	27.89b	12.5b	11.56b	6.06b	24.75b
15 شهریور 5 Sep.	43.05a	14.75a	13.62a	9.06a	29.68a
اول مهر 22 Sep.	20.47b	12.00b	9.62c	6.56b	23.00b
15 مهر 6 Oct.	26.14b	12.00b	6.60d	5.11b	14.12c
اول آبان 22 Oct.	12.27c	12.00b	5.69d	3.04c	11.37c

اعداد با حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری تفاوتی ندارند (LSD 5%)

- The numbers in each column with the same letters are not statistically different (LSD 5%)

گیاه به مراتب بیشتر است به گونه ای که در تاریخ کاشت های 15 مهر و اول آبان مقادیر نیترات دمبرگ به بیش از 4000 قسمت در میلیون افزایش یافت. در برخی از پژوهش ها حد مجاز نیترات برای اسفناج تازه 2500 قسمت در میلیون و برای اسفناج یخ زده و بسته بندی شده 2000 قسمت در میلیون در نظر گرفته می شود (10). در دیگر پژوهش ها حد مجاز نیترات بر اساس فصل کشت تعریف شده و برای تاریخ کاشت های 11 آبان تا 12 فرودین 3000 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تر و برای تاریخ کاشت های 13 فرودین تا 10 آبان 2500 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تر در نظر گرفته شده است (8).

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، مقدار جذب مجاز روزانه نیترات و نیتريت به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به ترتیب برابر 0/06 و صفر تا 3/7 میلی گرم گزارش شده است (2) معمولاً سبزیجاتی که در فصل پاییز در عرض های جغرافیایی بالا با مقدار

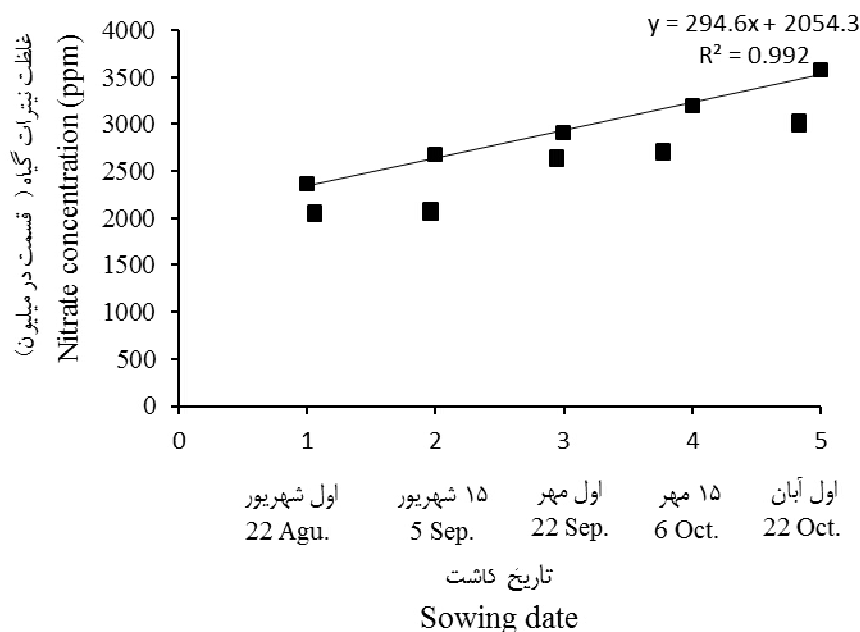
رابطه غلظت نیترات گیاه و مجموع درجه-روز - رشد دریافت شده در طول دوره رشد گیاه در تاریخ کاشت های مختلف در شکل 3 نشان داده شده است. در تاریخ کاشت اول شهریور که در آن بیش از 700 درجه-روز - رشد دما جذب شده است، مقدار نیترات بافت های گیاه کمتر از 2500 قسمت در میلیون است در حالی که در تاریخ کاشت اول آبان که در آن کمتر از 100 درجه-روز - رشد جذب گیاه شده، مقدار نیترات به بیش از 3600 قسمت در میلیون افزایش یافته است.

رابطه تاریخ کاشت و تجمع نیترات در بخش های مختلف گیاه اسفناج

همان طور که در شکل 4 نشان داده شده است مقدار نیترات در دمبرگ، پهنک و کل گیاه با تاخیر در تاریخ کاشت از اول اردیبهشت تا اول آبان افزایش معنی داری داشته است اما این افزایش در دمبرگ

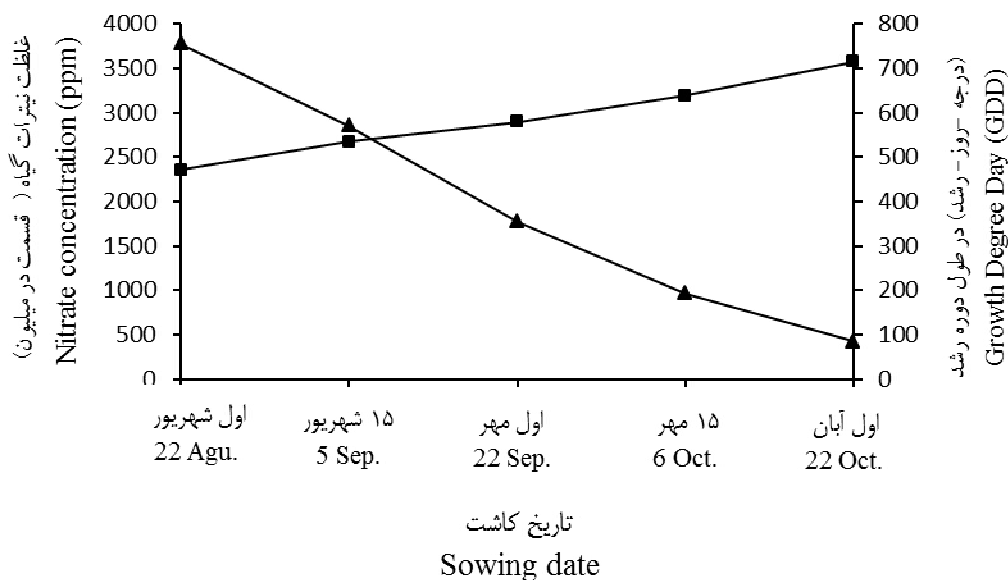
پهنگ برگ بیشتر است (برخلاف میزان اگزالات).

نور کم کشت شوند (به شرط غنی بودن نیتروژن خاک) با مشکل افزایش نیترات مواجه می شوند (23) مقدار نیترات در دمبرگ نسبت به



شکل 2- رابطه تاریخ کاشت اسفناج با غلظت نیترات گیاه

Figure 2- The relationship between sowing date and spinach nitrate concentrations



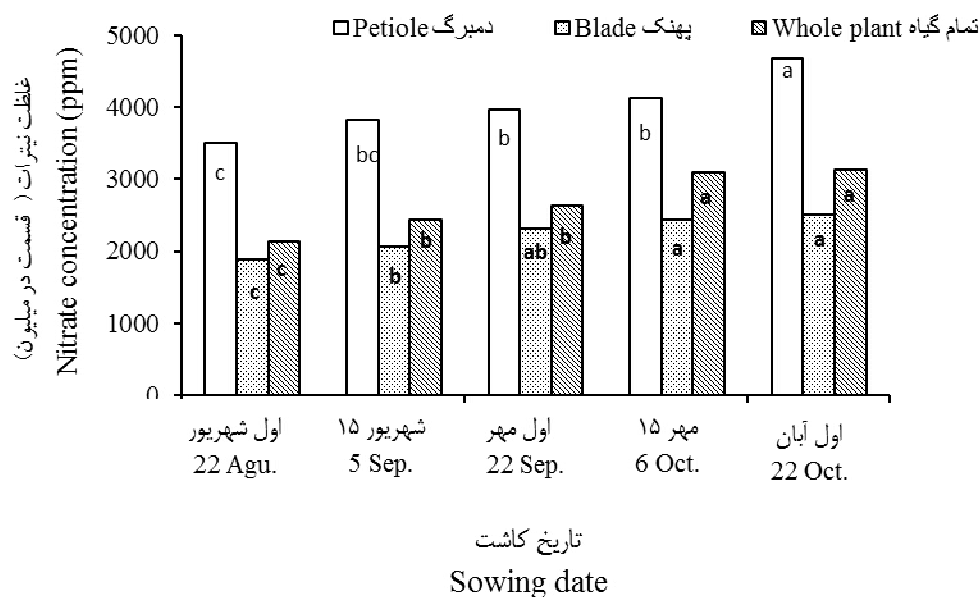
شکل 3- رابطه نیترات گیاه اسفناج با درجه-روز- رشد دریافتی در تاریخ کاشت های مختلف

Figure 3- The relationship between growth degree days received and spinach nitrate concentrations in different sowing date

فصل زمستان و بهار انجام شد، مقدار میانگین نیترات اسفناج در زمستان 886 و در بهار 748 میلی گرم در هر کیلوگرم وزن تر بود (23). برخی پژوهش ها نشان می دهد مقدار آنزیم نیترات ریداکتاز در

در آمریکا میزان نیترات برگ اسفناج دامنه ای از 130 تا 4100 و در کره دامنه ای از 427 تا 7439 میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن تر داشت (15). در پژوهشی که برای تعیین مقدار نیترات سبزیجات در دو

دمبرگ اسفناج (به ویژه ارقام وحشی) نسبت به پهنک کمتر بوده و دمبرگ‌ها به عنوان محلی برای ذخیره نیترات مطرح هستند (7).



شکل 4- رابطه تاریخ کاشت اسفناج با غلظت نیترات در قسمت های مختلف گیاه اسفناج

در هر اندام، حروف مشابه بیانگر عدم تفاوت معنی دار است (LSD %5)

The relationship between sowing date and nitrate concentrations in different parts of spinach- Figure 4

- In each organ, the same letters indicate no significant difference (LSD 5 percent)

داری بین طول و عرض پهنک برگ گزارش شده است ($0/829^{**}$) (9). رابطه مثبت مشابهی بین طول دم برگ و طول و عرض برگ مشاهده شد. نتایج بدست آمده نشان داد برای دستیابی به عملکردهای زیاده‌تر تعداد برگ ($r=44^{**}$)، طول برگ ($r=0/81^{**}$) و عرض برگ ($r=0/70^{**}$) هر سه دارای اهمیت بوده و انتخاب تاریخ مناسب کشت می تواند هر یک از این اجزاء را تحت تاثیر قرار دهد. در پژوهش حاضر با فاصله گرفتن از تاریخ کشت 15 شهریور (زودتر یا دیرتر) هر یک از سه جزء فوق به صورت منفی تحت تاثیر قرار گرفته است.

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، تاریخ کاشت نه تنها می تواند بر کمیت عملکرد تولیدی تاثیر داشته باشد، به شکل قابل توجهی بر کیفیت محصول و تجمع نیترات در اندام های گیاه اسفناج نیز اثر می گذارد. با توجه به این که معمولا تمام گیاه اسفناج (برگ به همراه دمبرگ) مورد استفاده قرار می گیرد و با عنایت به این مطلب که مقادیر نیترات در کل اندام های گیاه به ترتیب در تاریخ کاشت های اول شهریور، 15 شهریور، اول مهر، 15 مهر و اول آبان به ترتیب برابر 2135، 2438، 2620، 3089 و 3125 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تر (شکل 3)، انتخاب تاریخ کاشت های پس از 15 شهریور نه تنها موجب افت قابل توجه عملکرد می شود (جدول 3)، می تواند مخاطراتی نیز به جهت نیترات تجمع یافته در گیاه به همراه داشته باشد (حد مجاز نیترات برای تاریخ کاشت های این مطالعه 2500 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تر می باشد).

ضرایب همبستگی

ضریب همبستگی بین صفات آزمایشی در جدول 4 نشان داده شده است. این ضرایب بیانگر رابطه مثبت و معنی دار بین تعداد برگ و طول و عرض برگ (ضرایب همبستگی به ترتیب $0/40^{*}$ و $0/54^{*}$) بود. به طور مشابه در مقایسه 44 توده اسفناج ایرانی همبستگی معنی

جدول 4 - ضرایب همبستگی فنوتیپی صفات مورد مطالعه در اسفناج

Table 4- Phenotypic correlations coefficients among traits of study of spinach

ردیف	صفات	1	2	3	4	5	6
1	وزن تر Fresh yield	1					
2	طول برگ Leaf length	0.81**	1				
3	عرض برگ Leaf width	0.70**	0.62*	1			
4	طول دم برگ Petiole length	0.41*	0.31*	0.44*	1		
5	نیترات Nitrate	0.23 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.17 ^{ns}	1	
6	تعداد برگ Leaf number	0.44*	0.40*	0.54*	0.34*	0.04 ^{ns}	1

ns: غیرمعنی‌دار، *: معنی‌دار در سطح 5 درصد، **: معنی‌دار در سطح 1 درصد

ns: Non-significant; * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

منابع

1. Alamian M., Eftekhari S. A., Heidari M., Alamzadeh Ansari N. 2014. Evaluation of nitrate accumulation and nitrate reductase activity in different vegetative growth of selected Iranian land races of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). Journal of Crop Production and Processing, 3:25-36 (in Persian).
2. Anjana S.U., and Iqbal M. 2007. Nitrate accumulation in plants factors affecting the process, and human health implications. Agronomy for Sustainable Development, 27: 45-57.
3. Asadi H., and Hasandokht M. 2007. Study of genetic diversity on Iranian spinach genotypes. Journal of Agricultural Sciences, 38:257-265 (in Persian).
4. Bian Z.H., Chang Yang Q., and Liu W.K. 2015. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95:869-877.
5. Boese S.R. and Huner P.A. 1990. Effect of growth temperature and temperature shifts on spinach leaf morphology and photosynthesis. Plant Physiology, 94: 1830-1836.
6. Breimer T. 1982. Environmental factors and cultural measures affecting the nitrate content in spinach. Wageningen. Uni. 102pp.
7. Chiu C., Lin C., Hsia A.P., Ching Su, R., Lin H.L., and Tsay Y.F. 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. Plant and Cell Physiology, 45:1139-1148.
8. Citak S., and Sonmez S. 2010. Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacia oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. Scientia Horticulturae, 126: 415-420.
9. Eftekhari, A., and Hasandokht M.R., Fatahimoghadam M.R., and Kashi A. 2010. Iran spinach genetic diversity using morphological characteristics. Iranian Journal of Horticultural Science, 41:83-93 (in Persian).
10. Elia A., Santamaria P., and Serio F. 1998. Nitrogen nutrition, yield and quality of spinach. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76:341-346.
11. FAOSTAT .2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011) FAO, faostat.fao.org/.
12. Hord N.G., Tang Y., and Bryan N.S. 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. The American Journal of Clinical Nutrition, 90:1-10.
13. Imai S., and Higa T. 1994. Effect of EM on the Growth and Yield of Spinach. Second International Conference on Kyusei Nature Farming, October 7-11. Brasil, pp. 92-96.
14. Jafari P., and Jalali A.H. 2014. Yield and nitrate accumulation comparison in five Iranian spinach landraces in Isfahan province. Journal of Crop Production and Processing, 13:217-225 (in Persian).
15. Kaminishi A. and Nobuhiro K. 2006. Seasonal change of nitrate and oxalate concentration in relation to the growth

rate of spinach cultivars. HortScience, 41: 1589-1595.

16. Kunicki E., Grabowska A., Sekara A. and Wojciechowska R. 2010. The effect of cultivar type, time of cultivation, and bio stimulant treatment on the yield of spinach. Folia Horticulturae, 22:9-13.

17. Maroufi K., Farahani H.A. and Moaveni P. 2011. Effects of hydro priming on seedling vigor in spinach. Advances in Environmental Biology, 5:2224-2227.

18. Peyvast G.H. 2006. Olericulture. Daneshpazir Press, 487p (in Persian).

19. Ramadan A.Y. 2004. Effect of planting date and slow release nitrogen fertilizer on yield and quality of spinach. Ph.D. Thesis, Fac. Agric., Mansoura Univ., Egypt. 267pp.

20. Russel M.P., Wallace W., Olson R.A., and James P. 1984. Growth analysis based on degree days. Crop Science, 24:28-32 .

21. Salk A., Arın L., Deveci M., and Polat S. 2008. Special Vegetable Production. Onur Press, Tekirdag, 488 p.

22. Shahid Umar A., Iqbal M., and Abrol Y.P. 2007. Are nitrate concentrations in leafy vegetables within safe limits? Current Science, 92:355-360.

23. Shahlaei A., Alamzadeh Ansari N., and Sedighie F. 2007. Evaluation of nitrate and nitrite content of Iran southern (Ahwaz) vegetables during winter and spring of 2006. Asian Journal of Plant Sciences, 6:1197-1203.

24. Wen J., Bao S., Yang Q.C., and Cui H.X. 2009. Influence of R/B ratio LED lighting on physiology and quality of lettuce. Chinese Journal of Agrometeorology, 3:413-416.



The Effect of Planting Date on Yield and Nitrate Accumulation in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) in Esfahan Weather Conditions

P. Jafari^{1*} - A. Jalali²

Received: 01-06-2016

Accepted: 28-02-2017

Introduction: The fresh, steamed and boiled spinach were used because of antioxidant compounds that have great biological value. This plant is usually rich in nitrates that can play an important role in reducing heart attacks. Each year, more than 30% of the area under cultivation leafy vegetables in Iran, was allocated to spinach. Spinach growing in both spring and autumn or summer, has poor quality due to stem production. Higher spinach yield have been reported in autumn cultivation (compared to spring or winter planting). The nitrogen-rich lands, little light condition, excessive use of nitrogenous fertilizers and plants during the growing season short cause some plants like spinach, are faced with the problem of nitrate accumulation. The accumulation of nitrate in vegetables will be different depending on the species and genetic differences.

Materials and Methods: This research was conducted for two years in Kabootarabad Agricultural Research Station of Isfahan in order to determine the most suitable planting prickly seed spinach. Each year, of experiment was based on randomized complete block design with four replications and the results were reported based on two-year combined data analysis. Five planting dates at intervals of 15 days from the beginning of September had been adjusted. Prickly seed spinach was prepared from Seed and Plant Improvement Institute. In full leaf development stage and before the harvest of each plot, 10 plants randomly were selected and measured attributes including number of leaves, leaf length, leaf width and length of the petiole. In order to assess yield, two central rows of plants per plot (surface equivalent to two square meters) were analyzed after removing two distance of half a meter from each side. Nitrate samples were analyzed using ion analyzer. Statistical analyses of the data, correlated traits were performed using SAS software and comparisons of means using LSD at 5%.

Result and discussion: According to the results, year had no significant effect on traits. 5 September sowing date, GDD=571 was diagnosed as the best spinach planting date yielding 43 tons per hectare. Delayed planting date of 5 September to 22 October showed significant yield reduction and the amount of nitrate accumulation in plants also increased linearly. Number of leaves can be changed as one of the main factors influencing the performance of spinach according to cultivar and environmental conditions and in some studies they were ranged from 12 to 23. Amounts of nitrate accumulation in spinach were 2675, 2898, 3189 and 3571 ppm of fresh weight in different planting date of 5 September (571 GDD), 22 September (354 GDD), 6 October (193 GDD) and 22 October (84 GDD), respectively. The different sowing date, petiole nitrate accumulation varied from 3513 to 4680 ppm. Nitrate accumulation was ranged from 2135 to 3125 ppm wet weight in leaf blade. Different planting dates can influence on the length of day and intensity of light and thus can affect the amount of nitrate in plant. After planting date of August 22, temperature and radiation also reduced, and therefore it is natural that reduce the activity of the enzyme nitrate reductase and be more prepared conditions for nitrate accumulation. According to the World Health Organization, the uptake of nitrate and nitrite per kg of body weight daily allowance, equal to 0.06 and 0- 7.3 mg has been reported. The quality of light received by the plant also had an effect on nitrate accumulation, and red light compared to blue light has a greater role in stimulating the enzyme nitrate reductase activity and thus is more effective in reducing nitrate accumulation.

Conclusion: Climatic conditions affect the quantity and quality of vegetative organs. The results of this study showed that unsuitable spinach planting date will reduce not only yield, but also increases the concentration of nitrate (over 2500 ppm of fresh weight) and it may causes risks for consumers.

Keywords: Plant height, Leaf number, Growth degree days (GDD), Petiole

1- Research trainer, Horticulture Crops Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran

(*-Corresponding Author Email: peimanjafari@yahoo.com).

2- Assistant Professor, Horticulture Crops Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.



بررسی اثر نوع خاک پوش پلی اتیلنی بر رشد و عملکرد سیب زمینی (*Solanum tuberosum*)

خسرو پرویزی^{1*} - محمد رضا حسندخت² - بیتا آزاد³

تاریخ دریافت: 1395/03/12

تاریخ پذیرش: 1395/12/10

چکیده

به منظور بررسی تأثیر نوع خاک پوش پلی اتیلنی بر میزان رشد، زودرسی و عملکرد سیب زمینی پژوهشی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. عوامل مورد آزمایش شامل خاک پوش با پلاستیک پلی اتیلنی در پنج سطح شامل پلاستیک شفاف، پلاستیک سفید، پلاستیک سیاه، پلاستیک دولایه سفید و بدون خاک پوش و عامل رقم در دو سطح شامل دو رقم آگریا و سانه بود. در طول دوره رشد زمان لازم تا 80 درصد سبز شدن، تعداد روز تا غده زایی، ارتفاع گیاهان در مرحله گلدهی، قطر و تعداد ساقه اصلی در بوته، سطح برگ و طول دوره رشد اندازه گیری به عمل آمد. پس از برداشت غده های تولیدی به درجات مختلف تفکیک شده و درصد ماده خشک آن ها اندازه گیری شد. با نتایج تجزیه واریانس آزمایش مشخص شد که اثرات رقم و نوع خاک پوش پلی اتیلنی در اغلب صفات رشد معنی دار می باشد. خاک پوش اثر معنی داری بر درصد ماده خشک غده نداشت. اثرات متقابل رقم و خاک پوش در زمان لازم تا 80 درصد سبز شدن، تعداد ساقه اصلی، درصد غده های تولیدی در اندازه های مختلف و عملکرد کل معنی دار شد. در پوشش پلی اتیلنی شفاف در کوتاه ترین زمان ممکن، 80 درصد سبز شدن ایجاد شد. همچنین در پلی اتیلن شفاف در کوتاه ترین زمان ممکن و با تفاوتی معنی دار با سایر پوشش ها و نیز تیمار بدون خاک پوش، غده زایی انجام شد. در هر دو رقم، خاک پوش شفاف ارتفاع بوته بیشتری نسبت به سایر خاک پوش ها و تیمار بدون خاک پوش ایجاد کرد. واکنش رقم و نوع پوشش پلی اتیلنی در تعداد ساقه اصلی متفاوت بود و بیشترین میزان تولید ساقه با متوسط 4/22 عدد در رقم سانه و پوشش شفاف حاصل شد. پوشش های پلی اتیلنی اثرات قابل توجهی بر تعداد روز تا برداشت و درصد تولید غده در اندازه های کوچک (کوچک تر از 35 میلی متر و غیر قابل فروش)، اندازه متوسط (35 تا 55 میلی متر) و خوراکی (بزرگ تر از 55 میلی متر) و نیز عملکرد کل داشتند، هر چند پاسخ دو رقم به نوع پوشش ها متفاوت بود. در مجموع با تعدیل اثرات مثبت و منفی و بازاری پسنندی و همچنین عملکرد کل، پوشش شفاف با راندمان تولید غده بیشتر و با بازاری پسنندی نسبتاً بالاتر در مقایسه با سایر پوشش ها در تولید محصول سیب زمینی از برتری نسبی برخوردار بود.

واژه های کلیدی: بازاری پسنندی، پوشش پلاستیک، رقم، ماده خشک غده

مقدمه

تولیدات کپک های کوچک توسعه یافت و سرانجام با گلخانه های پلاستیکی کامل شد (3). خاک پوش ها به منظور تنظیم و تعدیل دمای خاک (خنک کردن در نواحی گرمسیر و یا گرم کردن در مناطق معتدله یا نیمه معتدله)، جلوگیری از تنش های رطوبتی، افزایش راندمان مصرف آب، مبارزه با علف های هرز، جلوگیری از سله بستن خاک و نوسانات دمایی، افزایش حاصلخیزی خاک، ممانعت از تجمع نمک ها در سطح خاک، مبارزه با عوامل بیماری زای خاک زی، جلوگیری از آلودگی محیط زیست و نیز ممانعت از فرسایش خاک مورد استفاده قرار می گیرند (29).

تخمین زده شده است که یک میلیون تن از خاک پوش پلاستیکی در سراسر جهان هر سال در بخش کشاورزی استفاده می شود (13). مصرف جهان خاک پوش پلی اتیلن با چگالی کم در حال حاضر در

استفاده از تکنیک های پوشش خاک ابتدا با یک سیستم ساده متشکل از هر نوع ماده آلی یا غیر آلی که به منظور پوشاندن خاک مورد استفاده قرار می گیرد، شروع شد و سپس به پوشش های ردیفی و

1- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات علوم زراعی - باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران
(*) نویسنده مسئول:
(Email: kparvizi@yahoo.com)

2- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
3- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

افزایش معنی دار در قطر و تعداد ساقه اصلی، وزن تر و خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته، وزن غده در هر بوته، عملکرد کل و درصد غده های متوسط و بزرگ در مقایسه با تیمار بدون پوشش شد. ضمن اینکه در تیمار خاک پوش درصد غده های بسیار کوچک به طور معنی داری کمتر از تیمار بدون پوشش بود (10).

با کاربرد خاک پوش پلی اتیلنی در رنگ های آلومینیومی، سفید، نقره ای و سیاه در سیب زمینی مشخص شد که در هر سه نوع خاک پوش وزن خشک ساقه و سطح برگ نسبت به تیمار بدون خاک پوش افزایش معنی دار داشت. در پلاستیک های با رنگ روشن عملکرد کل و عملکرد غده های با کیفیت درجه یک نسبت به پلاستیک سیاه بیشتر بود (15).

تأثیر استفاده توأم از خاک پوش کاه و کلش و پلی اتیلن و نیز سطوح مختلف آبیاری (60، 80، 100، 120 درصد نیاز آبی) بر عملکرد و کارایی مصرف آب در سیب زمینی توسط سلطانی تمجید و همکاران (26) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر متقابل خاک پوش و سطوح آبیاری بر عملکرد کل و کارایی مصرف آب معنی دار نشد و بیشترین کارایی مصرف آب با متوسط 14/96 کیلوگرم بر مترمکعب با تیمار پلی اتیلنی و سطح آبیاری 60 درصد حاصل شد. عملکرد کل در خاک پوش پلی اتیلنی نسبت به کاه و کلش با 20 درصد افزایش معنی دار شد.

اگرچه پژوهش های انجام گرفته در استفاده از خاک پوش پلی اتیلنی در سیب زمینی متنوع و گسترده می باشند؛ اما در شرایط متفاوت آب و هوایی و در وضعیت مکانی خاص و متفاوت از اجرای این آزمایش به انجام رسیده اند. ضمن این که تنوع پلاستیک مورد استفاده در پژوهش که تقریباً تمامی انواع موجود در بازار را در بر گرفته است در راستای تکمیل مطالعات قبلی می باشد و از این حیث که در شرایط آب و هوایی و مکانی متفاوت و متمایز از پژوهش های قبلی نیز صورت گرفته است، می تواند در نوع خود مورد توجه قرار گرفته و حاوی اطلاعات کاربردی مفیدی در مناطق اجرای طرح باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق در شرایط مزرعه ای و طی سال زراعی 1392-1393 در شهرستان اسدآباد واقع در استان همدان اجرا گردید. زمین موردنظر با ارتفاع 1500 متر از سطح دریا، در 10 کیلومتری جنوب غربی شهرستان اسدآباد در موقعیت جغرافیایی 35 درجه و 17 دقیقه شمالی و 47 درجه و 22 دقیقه شرقی و واقع شده است و دارای بافت خاک رسی شنی می باشد.

برای انجام این تحقیق از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار استفاده شد. عوامل مورد آزمایش شامل خاک پوش پلاستیک پلی اتیلنی در پنج سطح شامل پلاستیک شفاف،

حدود 700 هزار تن در سال است (8). فواید خاک پوش های پلی اتیلن برای تولید محصولات کشاورزی به خوبی مشخص شده است و قابلیت آن ها در موارد زیر به اثبات رسیده است: کمک به جذب عناصر غذایی بیشتر از طریق ریشه ها (32)، زودرسی و عملکرد بالاتر میوه ها (1)، بهبود کیفیت میوه و کاهش جمعیت شته ها به عنوان ناقل بیماری های ویروسی (24). در مقابل بالا بودن قیمت و ماندگاری در طبیعت از معایب خاک پوش های پلی اتیلنی می باشد (31).

خاک پوش های پلاستیکی به علت جذب نور و افزایش دمای خاک و همچنین فراهم آوردن رطوبت و عناصر غذایی قابل جذب برای گیاه، محصول را پیش رس می کنند (7). استفاده از خاک پوش پلاستیکی برای تسهیل زودرسی گیاهان به ویژه در مورد گونه های گرمادوست از قبیل فلفل (*Capsicum anum*)، توت فرنگی (*Fragaria ananassa*) و گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum* L) در حال افزایش می باشد (11). استفاده از خاک پوش در گوجه فرنگی عملکرد و کارایی مصرف آب را به میزان 30 درصد افزایش داده است (16).

در آزمایش های مختلف اثر خاک پوش های پلی اتیلنی بر عملکرد و صفات کمی و کیفی سیب زمینی مورد بررسی قرار گرفته است (14، 21، 29 و 30). با نتایج این آزمایش ها ثابت شده است که خاک پوش های پلاستیکی اثرات مثبتی بر افزایش کارایی مصرف آب آبیاری، وزن مخصوص ظاهری خاک، مقدار نشاسته، مقدار ویتامین C و عملکرد غده داشته اند. در یک آزمایش سه ساله (18) با مقایسه دو خاک پوش پلی اتیلنی سیاه و سفید و اثر آن ها بر رشد و عملکرد سیب زمینی مشخص شد که هر دو نوع خاک پوش اثر مثبتی بر سرعت و درصد سبز شدن سیب زمینی دارند. در این آزمایش حداکثر سبز شدن و با سرعت بیشتر در خاک پوش پلی اتیلنی سفید و حداقل سبز شدن در تیمار شاهد مشاهده شد. همچنین حداکثر میزان رشد در خاک پوش سفید مشاهده شد. در تیمارهایی که خاک پوش پلاستیکی به کار برده شده در مجموع میانگین عملکرد، در تیمارهای خاک پوش 6/2 تن بیش تر از تیمار شاهد بود.

با کاربرد خاک پوش پلاستیکی در سیب زمینی و حذف آن در سه زمان مختلف میانگین دمای روزانه خاک نسبت به تیمار شاهد 3/2 درجه سانتی گراد افزایش یافت. گیاهچه ها در تیمار با خاک پوش پلاستیکی و در زمان های مختلف 8/1 تا 11/7 روز زودتر از تیمار شاهد به 100 درصد سبز شدن رسیدند. خاک پوش به طور معنی داری ارتفاع گیاه، شاخص سطح برگ و ماده خشک سیب زمینی را افزایش داد. در نهایت گزارش شد که خاک پوش برای حدود 65 روز بعد از کاشت برای بهینه سازی رطوبت و دمای خاک ایده آل بوده و به نوبه خود به بهبود بهره وری سیب زمینی و افزایش راندمان مصرف آب در مناطق نیمه خشک کمک می کند (33).

خاک پوش پلی اتیلنی سیاه و شفاف در سیب زمینی منجر به

شد. در مرحله برداشت غده‌های تولیدی به سه اندازه کوچک‌تر از 30 میلی‌متر، 30 تا 50 میلی‌متر و بزرگ‌تر از 50 میلی‌متر تفکیک شده و توزین شدند. جهت اندازه‌گیری ماده خشک غده، در هر کرت سه غده به صورت تصادفی انتخاب و وزن هر غده یادداشت شد، سپس تک غده‌ها به صورت برگه درآمده و در آون با دمای 75 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت قرار گرفته و وزن آن‌ها ثبت گردید.

محاسبات آماری و آنالیز داده‌های حاصل، از طریق نرم‌افزار SAS (نسخه 9/2) انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جداول 1 و 2) نشان داد که در اغلب صفات رشد (به‌غیر از درصد ماده خشک غده) و اندازه غده‌های تولیدی در درجات مختلف و نیز عملکرد کل اثر خاک پوش پلی اتیلنی معنی‌دار شد. اثرات متقابل رقم و خاک پوش پلی اتیلنی در زمان لازم تا کسب 80 درصد سبز شدن، تعداد ساقه در بوته، درصد غده‌های کوچک و بدشکل، درصد غده‌های اندازه متوسط، درصد غده‌های خوراکی و نیز عملکرد کل حداقل در سطح پنج درصد معنی‌دار شد.

پلاستیک سفید، پلاستیک سیاه، پلاستیک دولایه سفید و بدون خاک پوش و فاکتور رقم در دو سطح شامل دو رقم آگریا و سانتیه بود. طول هر کرت 10 متر و عرض آن سه متر بود. در هر کرت آزمایشی چهار ردیف کاشت وجود داشته و نوار تیپ در وسط هر دو خط کاشت غده به صورت پشته تلفیقی (50×150 سانتی‌متر) قرار گرفت. کاشت غده‌ها با تراکم کاشت 56000 غده در هکتار انجام شد (25). خاک پوش‌های پلاستیکی روی هر دو پشته تلفیقی کشیده شده و فاصله بین بوته‌ها منافذی روی پلاستیک ایجاد شد. کاشت غده‌ها در تاریخ بیست و نهم فروردین‌ماه (تقریباً و هفته زودتر از تاریخ معمول در منطقه) انجام گرفت. آمار و اطلاعات مورد نیاز جهت محاسبه نیاز آبی به صورت روزانه از ایستگاه هواشناسی سینوپتیک اسدآباد اخذ گردید. روش آبیاری قطره‌ای سطحی و دور آبیاری ثابت (سه روزه) در نظر گرفته شد. حجم آب مصرفی توسط کنتورهای واسنجی شده اندازه‌گیری شد و بر اساس 100 درصد نیاز آبی سیب زمینی محاسبه و توزیع شد.

از صفات مرحله داشت شامل زمان لازم تا کسب 80 درصد سبز شدن، تعداد روز تا غده‌زایی، ارتفاع گیاهان در مرحله گلدهی، تعداد و سطح برگ اندازه‌گیری به عمل آمد. همچنین زمان رسیدگی گیاهان در تیمارهای مختلف ثبت و طول دوره رشد (تاریخ رسیدن) مشخص

جدول 1- تجزیه واریانس اثرات استفاده از خاک پوش پلی اتیلنی بر برخی از صفات رشد در دو رقم سیب زمینی
Table 1- ANOVA of the effect of polyethylene mulch on some growing traits in two potato cultivars

S.O.V منابع تغییرات	DF درجه آزادی	زمان لازم تا 80% سبز شدن Requirement time to 80% percent growing	تعداد روز تا غده‌زایی Days to tuberization	ارتفاع بوته در گلدهی Plant height in flowering time	تعداد ساقه در بوته Number of main stem	سطح برگ Leaf area
بلوک Block آگریا Agria	2	0.35	0.089	0.079	0.058	0.048
خاک پوش پلی اتیلنی Polyethylene mulch	4	0.004	0.042	0.036	0.039	0.021
خطا Error سانته Sante	9					
خاک پوش پلی اتیلنی Polyethylene mulch	4	0.012	0.022	0.010	0.026	0.018
خطا Error	9					
ضریب تغییرات C.V		3.50	7.97	9.45	18.32	22.32

*, ** به ترتیب بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 1 و 5 درصد و ns بدون اختلاف معنی‌دار
** *, and, ns represent the significant effect (P<0.01 0.05, and non significant respectively).

جدول 2- تجزیه واریانس اثرات استفاده از خاک پوش پلی اتیلنی بر اندازه غده های تولیدی، عملکرد کل و درصد ماده خشک غده در دو رقم سیب زمینی

Table 2- ANOVA of the effect of polyethylene mulch on tuber size, total yield and percentage of tuber dry matter in two potato cultivars

P>F							
S.O.V منابع تغییرات	DF درجه آزادی	تعداد روز تا برداشت Days to harvest	درصد غده‌های کوچک‌تر از 35 میلی‌متر Percentage of tubers smaller than 35 mm	درصد غده‌های با اندازه متوسط 35 تا 55 میلی‌متر Percentage of average tuber size from 35 to 55 mm	درصد غده‌های بزرگ‌تر از 55 میلی‌متر Percentage of tubers larger than 55 mm	عملکرد کل Total yield	درصد ماده خشک غده Dry tuber percentage
بلوک Block	2	0.126	0.160	0.320	0.042	0.08	0.032
آگریا Agria							
خاک‌پوش پلی‌اتیلنی Polyethylene mulch	4	0.012	0.035	0.041	0.031	0.041	0.081
خطا Error	9						
سانته Sante							
خاک‌پوش پلی‌اتیلنی Polyethylene mulch	4	0.008	0.008	0.028	0.018	0.023	0.097
خطا Error	9						
ضریب تغییرات C.V		2.10	16.22	25.05	8.12	11.23	12.46

*** به ترتیب بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال 1 و 5 درصد و ns بدون اختلاف معنی دار

*** and, ns represent the significant effect ($P < 0.01$, 0.05 , and non significant respectively)

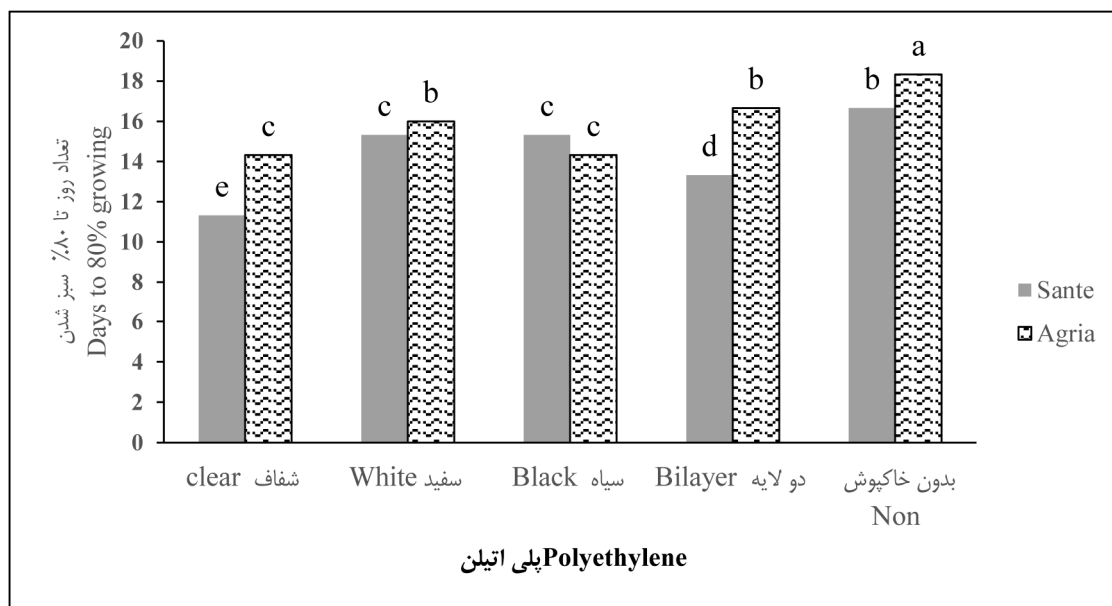
تابعی از روند بلوغ غده در مزرعه و همچنین در سطح بالاتری متأثر از شرایط محیطی غده در دوره انبارداری می باشد و در ارقام مختلف سیب زمینی متفاوت است. در شرایط یکسان از عمق کاشت و نیز بافت خاک، سرعت سبز شدن و خروج از کاشت در مرحله پس از کاشت و در مزرعه بیشتر تحت تأثیر دمای محیط خاک و رژیم رطوبتی در مزرعه قرار می گیرد (17 و 27). تفاوت قابل توجه در کسب 80 درصد سبز شدن و خروج از خاک در پوشش های پلاستیکی بیشتر انعکاسی از تأثیر آن ها بر دمای خاک و ایجاد شرایط متفاوت در ریز اقلیم مربوط به خود می باشد. مالچ پلاستیکی شفاف برخلاف مالچ سیاه تشعشعات خورشید را کمتر جذب می کند و در مقابل 85 تا 95 درصد نور را به طور نسبی انتقال می دهد. در زیر سطح مالچ های پلاستیکی شفاف معمولاً با قطرات کوچک آب پوشیده شده و طول موج های کوتاه نور به راحتی از این قطرات ریز عبور می نمایند، ضمناً بازتابش امواج حرارتی با طول موج بلند در مالچ های شفاف کمتر بوده و نسبت

با مقایسه میانگین نتایج مشخص شد که با پوشش پلی اتیلنی شفاف در کوتاه ترین زمان ممکن 80 درصد سبز شدن حاصل شد. سرعت سبز شدن 80 درصد در این پوشش به طور متوسط 2/91 روز سریع تر از سایر پوشش ها و تیمار بدون پوشش بود که تفاوت معنی دار با آن ها داشت. دو پوشش پلی اتیلنی سیاه و دولایه سفید وضعیت یکسانی در خروج بوته ها از خاک و سبز شدن آن ها داشتند و با متوسط 14/91 روز از نظر سرعت سبز شدن در موقعیت دوم قرار گرفتند و تفاوت معنی دار با خاک پوش تک لایه سفید و تیمار شاهد نشان دادند. دو رقم در دو پوشش پلی اتیلنی دولایه و سفید پاسخ متفاوتی از نظر کسب 80 درصد سبز شدن نشان دادند. به گونه ای که در رقم آگریا واکنش یکسانی داشتند اما در رقم سانته وضعیت یکنواختی نداشتند (شکل 1).

سرعت سبز شدن سیب زمینی در مزرعه وابستگی نزدیکی به سن فیزیولوژیکی غده بذری داشته و سن فیزیولوژیکی هم به نوبه خود

آزمایش بر سرعت سبز شدن و خروج از خاک مالچ شفاف قابلیت بیشتری نشان داد و پوشش شفاف با بیشترین تأثیر بر سرعت سبز شدن در هر دو رقم وضعیت ممتاز و متمایزی را نسبت به سایر پوشش‌ها و تیمار بدون پوشش ایجاد کرد.

به مالچ‌های سیاه بازتابش حرارت کمتری داشته و بیشتر به محبوس شدن حرارت در محیط خاک کمک می‌کنند؛ بنابراین ظرفیت نگهداری حرارت در مالچ شفاف نسبت به مالچ‌های سفید و سیاه بیشتر می‌باشد (3 و 6). در مقایسه اثر انواع مالچ مورد استفاده در این



شکل 1- اثر متقابل خاک پوش پلی اتیلنی × رقم بر زمان لازم تا کسب 80 درصد جوانه زنی در دو رقم سیب زمینی

اعداد با حروف مشترک دارای اختلاف معنی دار ($P \leq 0.05$) با استفاده از آزمون دانکن نمی باشند

Figure 1- Interaction effect of polyethylene mulch × cultivar on time requirement to 80% percent growing in tow potato cultivars

Means followed by the same letter had no significant difference ($P \leq 0.05$) based on Duncan's multiple range test

آمین‌ها و همچنین طول روز کوتاه تحریک کننده غده زایی می باشند (9، 19 و 22). از طرفی معلوم شده است که تأثیر عوامل محیطی و تغذیه‌ای بر فرآیند غده زایی به طور غیرمستقیم بر غده زایی از طریق تأثیر بر سطوح هورمون درون زاد جیبرلیک اسید و ترکیبات مشابه اعمال می گردد (2). تأثیر قابل توجه پوشش پلاستیکی شفاف بر زمان وقوع غده زایی به نظر می رسد متأثر از اثرات آن بر جذب بیشتر نور توسط خاک و افزایش دمای خاک و در نتیجه افزایش سرعت و قدرت جذب ریشه و در نهایت بالا رفتن کارایی و راندمان فتوسنتز باشد که متعاقب آن با سنتز ساکارز و دیگر مواد محرک لازم¹ در غده سازی زمینه ورود به این فرآیند سریع تر ممکن می گردد.

خاک پوش شفاف ارتفاع بوته بیشتری نسبت به سایر خاک پوش‌ها و تیمار بدون خاک پوش ایجاد کرد. به طور متوسط 5/53 سانتی متر ارتفاع بیشتری در این نوع خاک پوش در مقایسه با سایر خاک پوش‌ها ایجاد شد. در سایر خاک پوش‌های پلی اتیلنی ارتفاع گیاهان در زمان گلدهی وضعیتی هم سطح داشته و نسبت به تیمار بدون خاک پوش

غده زایی در دو تیمار خاک پوش سفید و شفاف با تفاوتی غیر معنی دار نسبت به همدیگر در سریع ترین زمان اتفاق افتاد که با متوسط 5/3 روز سریع تر نسبت به دو خاک پوش پلی اتیلنی و تیمار بدون خاک پوش غده زایی صورت گرفت و از نظر آماری نیز تفاوت معنی دار در سطح 5 درصد آزمون دانکن با آن‌ها ایجاد کرد. دو تیمار پلی اتیلنی سیاه و دو لایه از نظر تعداد روز تا غده زایی وضعیت نسبتاً مشابهی با تیمار بدون خاک پوش داشتند و تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد آزمون دانکن نداشتند (جدول 3).

غده زایی در سیب زمینی یک فرآیند پیچیده است و دربرگیرنده یکسری تغییرات آناتومیکی، مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و هورمونی است که منجر به تمایز یابی استولون‌ها و تبدیل شدن آن‌ها به غده می گردد (9). علاوه بر پاسخ‌های ژنتیکی و نوع رقم بر فرآیند غده زایی، عوامل محیطی (طول مدت تابش، کیفیت نور و درجه حرارت) و تغذیه (به ویژه سطوح نیتروژن) در این پدیده مؤثر می باشند. مشخص شده است که سطوح نیتروژن و درجه حرارت بالا از غده زایی ممانعت می کنند. در مقابل شدت نور بالا و غلظت بیشتر سوکروز، پلی

ارتفاع گیاهان به طور متوسط 6/14 سانتی متر بیشتر بود و از این نظر تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد با تیمار بدون خاکپوش داشتند (جدول 3).

افزایش ارتفاع بوته در خاکپوش شفاف احتمالاً به علت در دسترس بودن توأم رطوبت و فراهم شدن دمای مطلوب خاک توسط این نوع خاکپوش باشد. خاکپوش شفاف از نظر سرعت سبز شدن

نیز وضعیت مطلوب تری از سایر خاکپوش ها ایجاد کرد و این خود می تواند دلیل دیگری بر ارتفاع بیشتر گیاهان در زمان گلدهی نسبت به سایر خاکپوش ها و تیمار بدون خاکپوش باشد. تأثیر خاکپوش شفاف بر سرعت رشد و افزایش ارتفاع گیاهان با نتایج ونگ و همکاران (30) مطابقت دارد.

جدول 3- اثر خاکپوش پلی اتیلنی بر برخی از صفات رشد و درصد ماده خشک غده در سیب زمینی

Table 3-The effect of polyethylene mulch on some growing traits and tuber dry matter percentage in potato

نوع خاکپوش Polyethylene kind	تعداد روز تا غده زایی Days to tuberization	ارتفاع گیاهان در گلدهی Plant height in flowering time (cm)	سطح برگ Leaf area (cm ² per plant)	ماده خشک غده Tuber dry matter (%)
پلی اتیلن شفاف Clear polyethylene	46.83 ^b	62.5 ^a	6184.9 ^a	16.79 ^a
پلی اتیلن سفید White polyethylene	47.50 ^b	57.33 ^b	6411.3 ^a	15.46 ^a
پلی اتیلن سیاه Black Polyethylene	51.83 ^a	56.75 ^b	6106.4 ^a	16.02 ^a
پلی اتیلن دولایه Bilayer Polyethylene	52.50 ^a	56.83 ^b	59.41.8 ^a	16.12 ^a
بدون خاکپوش Non Polyethylene	53.16 ^a	50.83 ^c	5260.5 ^b	17.36 ^a

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P \leq 0.05$) با استفاده از آزمون دانکن نمی باشند

Numbers followed by the same letter in every column had no significant difference ($P \leq 0.05$) based on Duncan's multiple range test

به صورتی معنی دار بیشتر بود (جدول 4). این وضعیت با نتیجه تحقیق وداس و همکاران (28) در اثربخشی معنی دار خاکپوش پلی اتیلنی بر افزایش معنی دار ماده خشک غده مطابقت ندارد. به نظر می رسد اثر مثبت خاکپوش در افزایش عملکرد در این آزمایش بیشتر می تواند ناشی از تأثیر آن بر سطح سبز، میزان راندمان فتوسنتز و افزایش زیست توده متناسب با افزایش وزن تر غده و نهایتاً عملکرد تازه محصول باشد. به عبارتی به موازات افزایش ماده خشک غده، وزن تر آن نیز افزایش پیدا کرده و به نوعی اثرات آن را تعدیل نموده است که در نهایت افزایش معنی داری در درصد ماده خشک ریز غده در تیمارهای پلی اتیلنی در مقایسه با عدم استفاده از خاکپوش ایجاد نشده است. ضمن اینکه در مجموع هر نوع افزایش عملکرد در سیب زمینی لزوماً نمی تواند با افزایش درصد ماده خشک غده نیز همراه باشد.

تولید تعداد ساقه به شدت تحت تأثیر نوع خاکپوش و رقم قرار گرفت. بیشترین میزان تولید ساقه با خاکپوش شفاف و در رقم سانته حاصل شد که از این حیث به طور متوسط با افزایش 62 درصدی نسبت به تیمارهای دیگر پلی اتیلنی و بدون خاکپوش تفاوت معنی دار داشت. در مجموع دو رقم سیب زمینی واکنش متفاوتی از نظر تولید

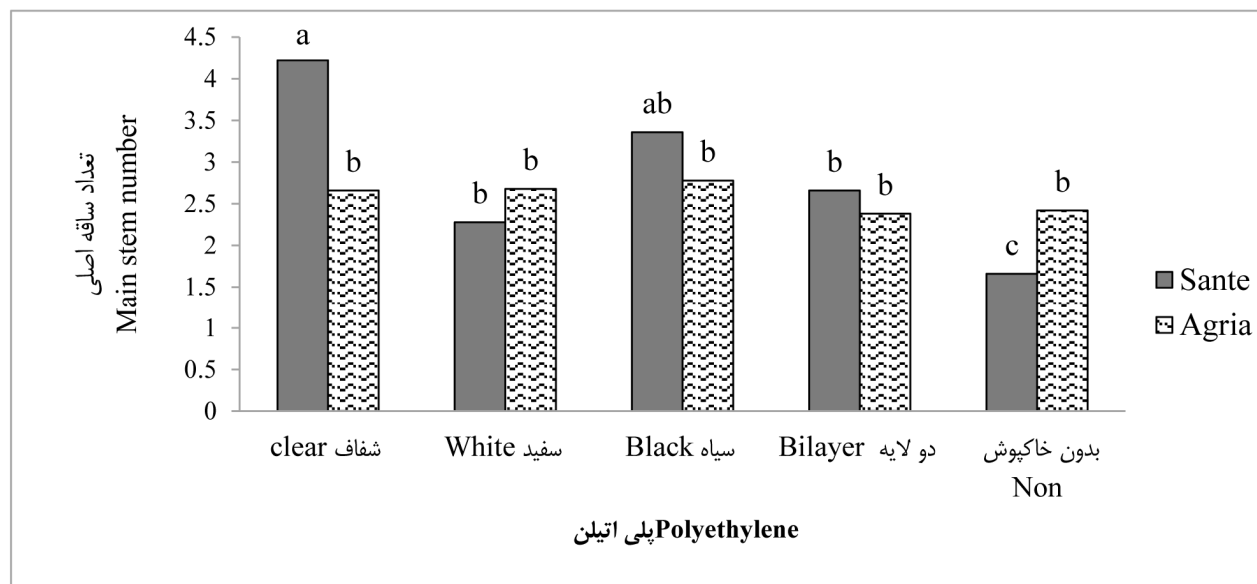
سطح برگ در هر دو رقم تحت تأثیر تیمارهای خاکپوش قرار گرفت. هر چهار نوع خاکپوش به صورت معنی داری سبب افزایش سطح برگ شدند و این تفاوت ها در سطح 5 درصد آزمون دانکن با تیمار بدون خاکپوش معنی دار شد (جدول 3).

تأثیر قابل توجه تیمارهای خاکپوش بر سطح برگ می تواند ناشی از تأثیر آن ها بر حفظ رطوبت، کاهش تنش رطوبتی و افزایش دمای خاک و در نتیجه جذب و انتقال مؤثر و فعال عناصر غذایی باشد که به نوبه خود با تحریک رشد منجر به افزایش سطح سبز گیاه خواهند شد. از طرف دیگر اثرات مثبت خاکپوش ها در کاهش رشد علف های هرز می تواند با کاستن از قدرت رقابت علف هرز با گیاه اصلی سبب تحریک رشد رویشی شده و سطح فعال فتوسنتزی را افزایش دهد. اثرات خاکپوش بر افزایش سطح برگ در سیب زمینی در این پژوهش با نتایج زائو و همکاران (33) و ایبارا - جیمenez و همکاران (15) مطابقت دارد.

در میزان درصد ماده خشک غده تفاوت معنی داری در تیمارهای مختلف خاکپوش پلی اتیلنی و بدون خاکپوش ایجاد نشد (جدول 3). در مجموع دو رقم از نظر درصد ماده خشک غده تفاوت معنی دار با همدیگر داشتند و در رقم آگرا نسبت به سانته درصد ماده خشک غده

ایجاد نشد اما در رقم سانتا این تفاوت‌ها معنی‌دار شد (شکل 2).

ساقه در تیمارهای مختلف خاک پوش و پلی اتیلن داشتند. در رقم آگریا تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف پلی اتیلنی و بدون خاک پوش



شکل 2- مقایسه میانگین اثر متقابل خاک پوش پلی اتیلنی و رقم بر متوسط تعداد ساقه اصلی در سیب زمینی

اعداد با حروف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) با استفاده از آزمون دانکن نمی‌باشند

Figure 2- mean comparison of interaction effect of polyethylene mulch and cultivar on number mean of main stem in potato
Means followed by the same letter had no significant difference ($P \leq 0.05$) based on Duncan's multiple range test

تفاوت قابل توجهی در میزان تولید ساقه در ارقام مختلف سیب زمینی وجود داشته و عموماً رقم آگریا در بین ارقام و کلون‌های مورد بررسی از ظرفیت ساقه دهی کمتری برخوردار می‌باشد که از این لحاظ نتایج این پژوهش تأییدی بر یافته‌های قبلی می‌باشد. اثرات خاک پوش شفاف در افزایش تعداد ساقه سیب زمینی در این پژوهش با نتایج تحقیق (5) در هندوانه (*Citrullus lanatus*) و فرهادی و کاشی (10) در استفاده از خاک پوش سیاه و شفاف در سیب زمینی همخوانی دارد.

به کارگیری پوشش‌های پلی اتیلنی اثرات قابل توجهی بر تعداد روز تا برداشت و طول دوره رسیدگی در هر دو رقم گذاشت. هرچند پاسخ دو رقم به نوع پوشش پلی اتیلنی و میزان اثرگذاری انواع پوشش‌ها متفاوت بود. در رقم آگریا طول دوره رشد از 120 روز در تیمار بدون خاک پوش به متوسط 113/16 روز کاهش پیدا کرد و اثرات کاهشی در دو پوشش پلی اتیلنی شفاف و سفید بیشتر بود. در رقم سانتا طول دوره رشد از متوسط 105 روز به 98 روز کاهش پیدا کرد و اثرات کاهشی در پوشش پلی اتیلنی دولایه بیشتر بود (جدول 5). اثرات خاک پوش‌های پلی اتیلنی در تسریع در برداشت و زودرسی محصول سیب زمینی در این پژوهش با نتایج سایر پژوهش‌ها در خیار (*Cucumis sativus*) (12)، در خربزه (*Cucumis melo*) (23) و در کدو (*Cucurbita pepo*) (6) مطابقت دارد.

نسبت فعال شدن جوانه‌های سیب زمینی روی غده هرچند صفتی وابسته به رقم می‌باشد اما به نوبه خود تحت تأثیر شرایط فیزیولوژیکی ابتدای رشد و سن فیزیولوژیکی غده بذری نیز قرار می‌گیرد (27). تأثیرپذیری میزان تولید ساقه از نوع پوشش پلی اتیلن انعکاسی از عوامل محیطی رشد در محیط خاک و میکروکلیمای بستر کاشت بر آهنگ فعال شدن جوانه‌های غده در مراحل اولیه کاشت می‌باشد. با توجه به اینکه غده‌های دو رقم از شرایط رشدی یکسان برخوردار بوده و همچنین در شرایط یکسان در انبار نگهداری شده بودند لذا عملاً در هنگام کاشت با شرایط فیزیولوژیکی نسبتاً مشابه در بستر کاشت قرار گرفتند و از طرفی تیمار خاک پوش از همان ابتدای کاشت انجام گرفت. لذا تغییرات حاصله در تعداد ساقه بیشتر می‌تواند ناشی از تأثیر میزان دمای خاک در تیمارهای مختلف خاک پوش بر تحریک رشد جوانه‌ها باشد. در عین حال که پاسخ نوع رقم نیز قابل توجه بوده و رقم سانتا به بهترین وجه نسبت به این تغییرات دما و رطوبت واکنش نشان داده است.

تعداد ساقه اصلی یکی از عوامل مهم در تعیین حجم کانوبی می‌باشد که در شرایطی که گیاهان با محدودیت سایر عوامل دخیل در فتوسنتز مواجه نشوند، می‌تواند در حجم اسیمیلایون نهایی اثربخش باشد (4). با نتایجی که در سال‌های قبل در ارزیابی ارقام و کلون‌های جدید سیب زمینی توسط پرویزی (20) صورت گرفت، مشخص شد که

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل خاکپوش پلی اتیلنی و رقم بر طول دوره رشد، درصد ماده خشک غده، اندازه غده تولیدی و عملکرد کل در سیب زمینی Table 4- mean comparison of interaction effect of polyethylene mulch and cultivar on growing period, tuber dry matter percentage, tuber size production and total yield of potato						
تیمارها treatments	طول دوره رشد Growing period (Days)	درصد غده‌های کوچک‌تر از ۳۵ میلی‌متر Percentage of tubers smaller than 35 mm	درصد غده‌های با اندازه متوسط ۳۵ تا ۵۵ میلی‌متر Percentage of tubers from 35 to 55 mm	درصد غده‌های بزرگ‌تر از ۵۵ میلی‌متر Percentage of tubers larger than 55 mm	عملکرد کل Total yield (t/ha)	ماده خشک غده Tuber dry matter (%)
آگریا × پلی اتیلن شفاف Agria × Clear polyethylene	112.66 ^b	10.04 ^a	44.12 ^a	66.23 ^b	52.7 ^b	17.28 ^a
آگریا × پلی اتیلن سفید Agria × White polyethylene	110.00 ^b	2.006 ^c	31.45 ^b	58.23 ^c	51.3 ^b	15.90 ^{ab}
آگریا × پلی اتیلن سیاه Agria × Black Polyethylene	114.66 ^c	4.61 ^b	31.93 ^b	52.25 ^d	36.8 ^c	16.23 ^{ab}
آگریا × پلی اتیلن دولایه Agria × Bilayer Polyethylene	115.33 ^c	1.92 ^{cd}	32.47 ^a	55.59 ^c	38.9 ^c	16.7 ^{ab}
آگریا × بنون خاکپوش Agria × Non Polyethylene	120.00 ^a	1.20 ^{de}	25.25 ^c	48.35 ^e	34.4 ^c	17.74 ^a
سانته × پلی اتیلن شفاف Sante × Clear polyethylene	98.66 ^f	1.92 ^{cd}	14.15 ^d	89.32 ^a	66.8 ^a	16.31 ^{ab}
سانته × پلی اتیلن سفید Sante × White polyethylene	100.33 ^e	0.7 ^e	10.29 ^e	85.14 ^a	65.3 ^a	15.12 ^b
سانته × پلی اتیلن سیاه Sante × Black Polyethylene	102.33 ^e	0.85 ^e	11.06 ^e	88.85 ^a	63.8 ^a	15.81 ^b
سانته × پلی اتیلن دولایه Sante × Bilayer Polyethylene	94.00 ^g	0.96 ^e	9.36 ^e	89.63 ^a	60.2 ^a	15.54 ^b
سانته × بنون خاکپوش Sante × Non Polyethylene	105.00 ^d	0.75 ^e	8.94 ^e	83.33 ^a	55.2 ^b	16.98 ^{ab}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.05) با استفاده از آزمون دانکن نمی‌باشند
Numbers followed by the same letter in every column had no significant difference (P<0.05) based on Duncan's multiple range test

آگria وضعیت ممتاز و قابل توجهی در این نوع پوشش داشت. لذا تولید بیشتر غده کوچک در رقم آگria و در پوشش شفاف به عنوان اثر منفی این نوع پوشش با اثرات مثبت آن در تولید میزان بیشتری از غده متوسط، خوراکی و نهایتاً عملکرد کل جبران شده و قابل چشم پوشی می باشد. در عین حال در پوشش سفید و در رقم آگria تولید غده کوچک پایین تر بود و این وضعیت با تولید غده متوسط و خوراکی بیشتر و در ضمن عملکرد بالاتر همراه شد که نقطه قوت و سازگاری بالاتر این نوع پوشش در رقم آگria می باشد.

در رقم سانه استفاده از انواع مختلف خاک پوش پلی اتیلنی اثرات مثبت و نسبتاً یکنواختی در میزان عملکرد کل داشت. با این نتایج مشخص شد که نوع رقم در سیب زمینی در کارایی خاک پوش ها اثرات چشمگیری داشته و به نظر می رسد در ارقامی با طول دوره رشد طولانی و ارقام دیررس تر اثرات متفاوت تری از خاک پوش ها حاصل خواهد شد. بیشترین اثر مثبت مالچ در بهبود رشد و عملکرد سیب زمینی می تواند ناشی از توانایی آن در افزایش دمای خاک و کاهش نسبی در دمای پوشش اندام هوایی¹ باشد که با این وضعیت جذب آب و مواد غذایی افزایش یافته و با بالا رفتن ظرفیت فتوسنتز کارایی مصرف آب نیز افزایش می یابد. در مقابل با بازتابش کمتر نور و کاهش دمای سایه انداز از بروز تنش های احتمالی در سیب زمینی کاسته و با کاهش تبخیر و تعرق (ضریب خشکی) از هدر رفت آب نیز می کاهد. به نظر می رسد دو نوع پلی اتیلن شفاف و سفید در بهبود این وضعیت بهتر عمل کرده و در سیب زمینی نسبت به مالچ سیاه بیشتر قابل توصیه باشند.

نتیجه گیری کلی

با نتایج این پژوهش به خوبی مشخص شد که پوشش های پلی اتیلنی اثرات قابل توجهی بر افزایش قدرت رشد، کاهش طول دوره رشد و در نتیجه بر زودرسی سیب زمینی دارند. همچنین بر عملکرد کل و تولید غده در اندازه های مختلف اثرات مثبت و منفی دارند. در بیشتر صفات رشد و همچنین عملکرد کل پاسخ متفاوتی نسبت به نوع پوشش ایجاد شد و به نظر می رسد پوشش پلی اتیلنی شفاف قابلیت و کارایی بهتری نسبت به سایر پوشش های پلی اتیلنی در سیب زمینی داشته باشد.

مقایسه میانگین داده ها در تولید غده های اندازه کوچک حاکی از اثر منفی دار نوع خاک پوش بر درصد تولید غده ها در این اندازه بود. در رقم آگria با خاک پوش پلی اتیلنی شفاف بیشترین میزان غده کوچک تولید شد که اختلاف معنی داری با تیمار بدون خاک پوش و سایر تیمارهای پلی اتیلنی در این رقم و نیز رقم سانه ایجاد کرد. در رقم سانه هرچند در همین تیمار خاک پوش درصد بیشتری غده کوچک تولید شد اما با میانگین 1/9 درصد از میزان کمتری برخوردار شد. در رقم سانه سه تیمار دیگر خاک پوش (پلی اتیلن سفید، سیاه و دولایه) و بدون خاک پوش وضعیت یکسانی از نظر درصد تولید غده کوچک داشتند. در حالی که در رقم آگria پاسخ ها نسبتاً متفاوت بود و واکنش یکسانی به وجود نیامد. در تولید غده متوسط نیز در دو رقم پاسخ متفاوتی ایجاد شد. رقم آگria به شدت متأثر از پوشش پلی اتیلنی بود. در حالی که در رقم سانه این وضعیت برقرار نشد و تفاوت معنی داری از نظر درصد تولید غده متوسط بین تیمارهای خاک پوش و بدون خاک پوش ایجاد نشد. از نظر تولید درصد غده خوراکی، وضعیتی مشابه غده متوسط حاصل شد و واکنش دو رقم به پوشش پلی اتیلنی و خاک پوش متفاوت بود. در رقم آگria تفاوت معنی داری در تولید غده خوراکی در پوشش ها ایجاد شد. در حالی که رقم سانه از این نظر پاسخ یکسانی داشت. هرچند در مجموع درصد غده خوراکی در رقم سانه در مقایسه با رقم آگria در تمامی تیمارها بسیار بیشتر بود. از نظر عملکرد کل در رقم آگria تیمارهای خاک پوش تفاوت معنی داری با همدیگر و همچنین با تیمار بدون خاک پوش داشتند. در رقم آگria دو پوشش پلی اتیلنی سفید و شفاف بیشترین میزان عملکرد را داشتند که با همدیگر تفاوت معنی داری نداشتند اما با دو نوع دیگر خاک پوش و تیمار بدون خاک پوش تفاوت معنی دار نشان دادند. در رقم سانه تفاوت معنی داری از نظر عملکرد کل بین تیمارهای پلی اتیلنی ایجاد نشد اما تفاوت آن ها با تیمار بدون خاک پوش معنی دار شد (جدول 4). غده های تولید شده به عنوان غده کوچک (کوچک تر از 30 میلی متر) معمولاً غده هایی را شامل می شود که در صنایع فرآوری و یا مصرف خوراکی نمی توانند مورد استفاده قرار گیرند. همچنین این غده ها از نظر بذری نیز قابلیت کمتری جهت کشت در مزرعه داشته و اغلب جزء ضایعاتی محصول را تشکیل می دهند. در رقم آگria اگرچه تولید بیشتر اندازه کوچک با پوشش پلی اتیلنی شفاف ایجاد شد، اما در مقابل در میزان غده بذری و غده خوراکی و نیز عملکرد کل نیز رقم

منابع

- 1- Abdul-Baki A., Spence C., and Hoover R. 1992. Black polyethylene mulch doubled yield of fresh market field tomatoes. Horticultural Science, 27: 787-789.

- 2- Amador V., Bou J., Martines G.J., Monte E., Rodriguez –Falcon M., Russo E. and Part S. 2001. Regulation of potato tuberization by day length and gibberellins. *International of Journal Development Biology*, 45: 37-38.
- 3- Amidon R. 1994. Use and disposal of plastics in agriculture. Prepared by Amidon Recycling for the American Plastics Council. 95 p.
- 4- Awari H.W., and Hiwase S.S. 1994. Effect of irrigation systems on growth and yield of potato. *Annual of Plant and Physiology*, 8 (2): 185-187.
- 5- Ban D., Zanic K., Dumicic G., Gotlin Culjak T. and Goreta S. 2009. The type of polyethylene mulch impacts vegetative growth, yield, and aphid populations in watermelon production. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 7 (3&4): 543-550.
- 6- Bhatt L., Rana R., Uniyal S., and Singh V. 2011. Effect of mulch materials on vegetative characters, yield and economics of summer squash (*Cucurbita pepo*) under rainfed mid-hill condition of uttarakhand. *Department of Vegetable Science*. 38 (2): 165-168.
- 7- Diaz-Perez J. 2009. Root zone temperature plant growth and yield of broccoli as affected by plastic film mulches. *Department of Scientia Horticulture*, 123: 159-163
- 8- Espi E., Salmeron A., Fontecha A., Garcia Y., and Real A.I. 2006. Plastic films for agricultural applications. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 22: 85-102.
- 9- Ewing E.E. 1997. *The Potato Crop*. Wien, H.C(ed). "The physiology of vegetable crops". CABI publishing. P. 295-340.
- 10- Farhadi B., and Kashi A. 2002. Evaluation the effects of plastic mulchs, cropping patern and interval irrigation on growth and yield of potato. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 4: 115-120. (in Persian with English abstract)
- 11- Farhadi Ai. 2002. Effect of polyethylene mulchs and cultivation methods on cucumber. Final Report of Project, Agricultural and Natural Research Center of Esfahan. Iran 33 p.
- 12- Fonseca I.C.B., Goto R. and Neves C.S.V. 2003. Colored polyethylene soil covers and grafting effects of cucumber flowering and yield. *Scientia Agricola*, 60 (4): 643-649.
- 13- Halley P., Rutgers R., Coombs S., Kettels J., Gralton J., Christie G., Jenkins M., Beh H., Griffin K., Jayasekara R., and Lonergan G. 2001. Developing biodegradable mulch films from starch-based polymers. *Starch*, 53: 362-367.
- 14- Hou X.Y., Wang F.X., Han J.J., Kang S.Z., and Feng S.Y. 2010. Duration of plastic mulch for potato growth under drip irrigation in an arid region of Northwest China. *Agricultural and Forest Meteorology*, 150: 115–121.
- 15- Ibarra-Jimenez L., Lira-Saldivar R.H., Valdez-Aguilar L.A., and Lozano-Del Rio J. 2011. Colored plastic mulches affect soil temperature and tuber production of potato. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science*, 61: 365-371.
- 16- Jolaini M. 2011. Investigation the effect of different water and plastic mulch levels on yield and water use efficiency of tomato in surface and subsurface drip irrigation method. *Journal of Water and Soil*, 25 (5): 1025-1031. (in Persian with English abstract)
- 17- Kumar p., Pandey S. K., Singh S. V., and Kumar D. 2006. Irrigation requirement of chipping potato cultivars under west Indian Plains. *Potato Journal*, 34: 3-14.
- 18- Masud Mahmood M., Farooq K., Hussain A., and Sher R. 2002. Effect of mulching on growth and yield of potato crop. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2: 132-133.
- 19- Obrien P.J., Allen, E.J., and Friman D.M. 1998. A review of some studies into tuber initiation in potato crops. *Journal of Agricultural Science*, 130: 251- 270.
- 20- Parvizi k. 2007. Evaluation and comparison of quantitative yield traits of new potato clones. Annual Report of Research Design, Agricultural and Natural Resources Research Center of Hamedan. 35 p. (in Persian with English abstract)
- 21- Qina S., Zhanga J., Dai H., Wang D., and Li D. 2014. Effect of ridge–furrow and plastic-mulching planting patterns on yield formation and water movement of potato in a semi-arid area. *Agricultural Water Management*, 131: 87– 94.
- 22- Rodriguez- falcon M., Bue J., and Part S. 2006. Seasonal control of tuberization in potato: conversed elements with the flowering response. *Annual. Review of Plant. Biol*, 57: 80- 151.
- 23- Schales F.D and Sheldrake R. 1995. Mulch effects on soil condition and muskmelon response. *American Society for Horticultural Science*, 88: 425-448.
- 24- Singh S.P., 1992. Studies on mulching of vegetable crops-a review. *Advances in Horticulture and Forestry*, 2: 115-143.
- 25- Soltani H. 2014. Amendment of potato techniques cultivation. National Symposium of Potato, Bu Ali sina University, Hamedan, Iran. (in Persian with English abstract)
- 26- Soltani tamjid A., Fathi P., and Hossein panahi F. 2015. Effect of irrigation and polyethylene mulch and wheat straw on yield and water use efficiency in potato under under tape irrigation in Dehgoulan plain. *Iranian Journal of Water Research in Agriculture*, 29 (3): 341-351. (in Persian with English abstract)
- 27- Soufian M., and Emadi M. 1992. Botanical of Potato, systematic and morphology. Agricultural Research Organization Press, Agricultural Research Center of Hamedan. 35 p.

- 28- Wadas W., Jablonska-Ceglarek R., and Kosterna E. 2004. Effect of plastic covering and nitrogen fertilization on yield and quality of early potatoes. *Folia Horticulturae*, 16 (2): 41-48.
- 29- Wang F.X., Feng S.Y., Hou X.Y., Kang S.Z., and Han J.J. 2009. Potato growth with and without plastic mulch in two typical regions of Northern China. *Field Crops Research*, 110: 123-129.
- 30- Wang F.X., Wu X.X., Shock C., Chu L.Y., Gu X.X., and Xue X. 2011. Effects of drip irrigation regimes on potato tuber yield and quality under plastic mulch in arid Northwestern China. *Field Crops Research*, 122: 78-84.
- 31- Waterer D. 2010. Evaluation of biodegradable mulches for production of warm season vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Science*, 90: 737-743.
- 32- Wien H.C., Minotti P.L., and Grubinger V.P. 1993. Polyethylene mulch stimulates early root growth and nutrient uptake of transplanted tomatoes. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 118 (2): 207-211.
- 33- Zhao H., Xiong Y.C., Li F.M., Wang R.Y., Qiang S.C., Yao T.F., and Mo F. 2012. Plastic film mulch for half growing-season maximized WUE and yield of potato via moisture-temperature improvement in a semi-arid agro ecosystem. *Agricultural Water Management*, 104: 68-78.



Effect of Different Plastic mulch on Growth and Yield of Potato (*Solanum tuberosum*)

Kh. Parvizi^{1*} - M.R. Hassandokht² - B. Azad³

Received: 01-06-2016

Accepted: 28-02-2017

Introduction: The advantages of plastic mulches have been known in production of agricultural crops. Their capability have been demonstrated to help nutrition uptake, precocity and yield of fruit trees, and decreasing of aphid population as viruses pest vectors. It is also demonstrated some advantages of plastic mulch on some traits in potato such as increasing growth rate, yield and number of medium tuber size. Also, the effects of combined use of straw, chopped and polyethylene as well as different levels of irrigation (60, 80, 100, 120% water requirement) on yield and water use efficiency in potato have been investigated. In previous studies, it is concentrated on the effect of the special type of plastic on growing aspect of potato and there is no comparative assessment between different types of the mulches. So that in this research we evaluated the responses between types of plastic mulches.

Material and Methods: this research was conducted under field conditions. A factorial experiment was designed based on randomized complete block design with three replications. The experimental treatments consisted of mulch in five levels (clear, white, black, double layer and control (without mulch)) and two cultivars (Agria and Sante). Each plot was designed in 4 m². For every plot, ridges were divided into complicated double rows with 50 × 150 centimeters wide. Irrigation tapes were placed between every duplicated row. Water requirement was calculated through corrected evapotranspiration (ET_c) by Penman-Monteith equation with considering 90% water use efficiency. During the growing season some characteristics such as requirement time to 80% emergence, tuberization time, plant height in flowering time, number of stems and leaf area have been measured. Harvesting time was recorded along with measurement of tuber weights. Total yield was measured by random selection of one m² in each plot. Harvested tubers were separated based on three sizes; edible tuber (large tuber), average tuber and small tuber size. Tow-way analysis of variance (ANOVA) of data was carried out using SAS software and means were compared by Duncan's Multiple Range Test at probability level of 5%.

Results and Discussions: The results of the experiment showed that application of plastic mulch and cultivar had significant effect ($P \leq 0.01$) on most of growing traits. Effect of cultivar and plastic mulch had no significant different on tuber dry matter. Mean comparison of 80% emergence date, number of main stem, growth duration, ranking of tubers size and total yield showed significant effect between cultivars and plastic mulches. Sante cultivar with clear mulch reach in shortest time to 80% emergence (11.3 days) and tuberization time (46.46 days). Significant difference between polyethylene mulches in emergence date is due to the effect of mulch characteristics on soil temperature and moisture. Consequently, soil microclimate would be changed and growth habits of potato plant inclined to suitable responses. Clear plastic mulch had highest plant height and number of main stem compared to other mulches and control treatment. Leaf area also affected by mulches; so that four types of plastic mulches had more leaf area comparison to control. Significant effect of mulch treatments on leaf area can be related to conservation of moisture and reduction of water stress. Meanwhile, increasing of uptake and transferring of mineral nutrient can be promoted growth rate. All this reaction can increase leaf area in plastic mulch treatments. Totally, application of plastic mulches could improve growth rate, growth duration and total yield of potato.

Conclusions: The result of this research showed that polyethylene mulch can obviously increase growth rate as well reduce growth duration. Also, plastic mulch can significantly increase total yield and positive reaction effect on tuber size. Different types of plastic mulches showed different responses on growth traits and total yield. It seems clear mulch be more capable in the most traits and total yield compared with other plastic.

Keywords: Cultivar, Marketable, Polyethylene mulch, Tuber dry matter

1 -Assistant of Professor, Horticulture Crops Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran

(*-Corresponding Author Email: kparvizi@yahoo.com)

2 -Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran

3 -Ms Degree of Horticultural Science, Islamic Azad University, Sciences & Research Branch, Hesarak, Tehran, Iran



اثر رقم و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای لیلیوم با استفاده از ریزنمونه‌های TCL

احمد شریفی^{*1} - فاطمه کیخا آخر² - محبوبه یزدی³ - عبدالرضا باقری⁴

تاریخ دریافت: 1395/03/30

تاریخ پذیرش: 1396/04/09

چکیده

لیلیوم به عنوان چهارمین گل شاخه بریده دنیا مطرح است و روش کشت بافت، روش مناسبی را برای تکثیر این گیاه زینتی فراهم کرده است. در این پژوهش به منظور بررسی عوامل مؤثر بر باززایی لیلیوم از پیازک‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای دو آزمایش جداگانه انجام گرفت. در مرحله اول، اثر ریزنمونه‌های با لایه سلولی نازک (TCL) با ضخامت‌های 1، 3 و 5 میلی‌متر در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک (MS) حاوی ترکیب‌های تنظیم کننده رشد گیاهی BA، 2ip و Kin با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که در هر سه تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی، بیشترین میزان اندام زایی در ریزنمونه‌هایی با ضخامت 3 میلی‌متر بدست آمد. در واقع نتایج برهمکنش اندازه ریزنمونه با تنظیم کننده رشد گیاهی موجود در محیط کشت نشان داد درصد باززایی در ریزنمونه‌های با ضخامت 3 میلی‌متر بهتر افزایش داشته است. بیشترین تعداد برگ و وزن خشک گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی BA مشاهده شد که نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. در آزمایش دوم به منظور بررسی اثر رقم و نوع تنظیم کننده رشد گیاهی سیتوکینین، ریزنمونه‌های TCL ارقام Nymph، Donato، Robina، Roxana و Lessoto با ضخامت 3 میلی‌متر در محیط کشت MS حاوی ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی مختلف (BA، Kin، 2ip و TDZ) با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. نتایج نشان داد که رقم به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر اندام زایی بود. بیشترین تعداد ریشه، وزن خشک، تعداد پیازک و طول گیاهچه در رقم Roxana مشاهده شد. بررسی درصد باززایی و شاخه‌زایی در ریزنمونه‌ها نشان داد که ارقام و هورمون‌های مختلف بر میزان باززایی و ریشه‌زایی مؤثر بوده و رقم Nymph در حضور TDZ نسبت به سایر ارقام و تنظیم کننده های رشد گیاهی کمترین باززایی و ریشه‌زایی را نشان داد. همچنین مقایسه وزن خشک در تیمارهای مختلف نشان داد که وزن خشک گیاهچه‌های رقم Roxana بطور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافته بود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، ریزازدیادی، ریزنمونه فلس، سیتوکینین، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

بومی مناطقی در نیمکره شمالی از جمله آسیا (چین و ژاپن)، آمریکای شمالی، اروپا (نواحی مدیترانه) و شمال آفریقا می‌باشد. تکثیر لیلیوم از طریق جدا کردن فلس‌های پیازی و پاجوش‌هایی که از خود گیاه تولید می‌شود و یا کاشت بذر انجام می‌پذیرد. اما از آنجایی که تکثیر از طریق بذر به مدت زمان زیادی نیاز داشته و هیبریداسیون جنسی این گیاه برای تولید ارقام جدید با موانع و مشکلات فراوانی همراه می‌باشد، عمدتاً ازدیاد آن از طریق تکثیر غیر جنسی انجام می‌شود (1). در سه دهه گذشته اهمیت لیلیوم به عنوان گیاه زینتی بطور فزاینده ای افزایش یافته است. در هلند سطح زیر کشت تولید پیاز های لیلیوم از 100 هکتار در سال 1966 به حدود 5000 هکتار در سال 2001 افزایش یافته و به تولید تقریباً 1000 میلیون پیاز رسیده است (20).

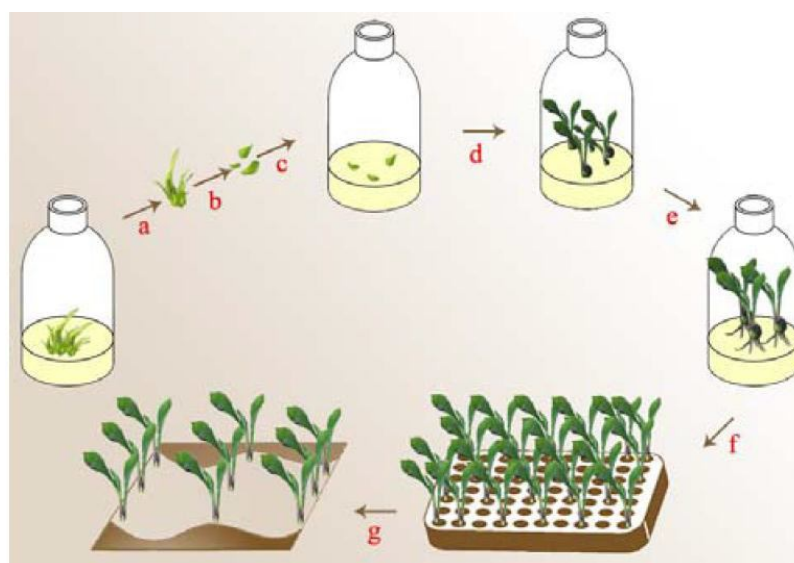
لیلیوم یکی از گل‌های پیازی مهم است که به صورت گسترده‌ای در بازار جهانی و از جمله ایران استفاده می‌شود (2). زیبایی، شکل خاص و طیف رنگی گل‌ها به همراه ماندگاری نسبتاً قابل توجه آنها سبب شده است که جزو 10 گل برتر جهان قرار گرفته و از نظر تجارت گل‌های شاخه بریده، رتبه چهارم را دارا باشد (18). گیاه لیلیوم

1 و 2- استادیاران گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی استان خراسان رضوی

(* - نویسنده مسئول: Email: ahmadsharifi66@yahoo.com)

3 و 4- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.55475



شکل 1- ریزازدیادی لیلیوم از فلس‌های پیاز در شرایط این ویترو، (a) پیاز بالغ، (b) فلس‌های پیاز، (c) فلس‌های کشت شده، (d) شاخه‌های باززایی شده، (e) گیاهچه‌های تولید شده، (f) گیاهچه‌های سازگار یافته و (g) گیاهان انتقال یافته به بستر کشت

Figure 1- Micropropagation of *Lilium* from bulb scales *in vitro*, a) bulb, b) bulb-scales, c) cultured bulb-scales, d) regenerated shoots, e) plantlets, f) acclimated plantlets, g) plants in a field

بیشتر سلول‌ها در معرض تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، میزان باززایی و اندام زایی را افزایش می‌دهد (19). از آنجایی که خواب پیاز یک عامل محدودکننده در باززایی پیازک گونه‌های لیلیوم است، به همین دلیل از ریزنمونه TCL که از چند لایه سلول تشکیل شده است در ترکیب با سیتوکینین برای شکستن خواب، استفاده می‌کنند (4). اندام زایی از اندام‌های خاص ممکن است بطور مؤثری از طریق استفاده از این روش به همراه شرایط کنترل شده درون‌شیشه‌ای و کاربرد خارجی تنظیم کننده‌های رشد امکان‌پذیر باشد (19). در مطالعه‌ای که تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی گیاه لیلیوم (*Lilium ledebourii*) با استفاده از روش کشت لایه‌های سلولی نازک عرضی² (tTCL) مورد بررسی قرار گرفت، افزودن BA به محیط کشت باعث اندام زایی شد و تقریباً 4/4 پیازک در هر ریزنمونه تولید شد (11). علاوه بر این در روش کشت لایه‌های سلولی نازک، اندازه ریزنمونه نیز در کارایی باززایی ریزنمونه مؤثر است. نات و همکاران (2001a) نشان دادند که در کشت ساقه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) ریزنمونه‌هایی با ضخامت 1 میلی‌متر قدرت باززایی بالاتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشتند.

علی‌رغم انجام کارهای گسترده تحقیقاتی در زمینه کشت بافت لیلیوم در خارج از کشور، تحقیقات صورت گرفته در داخل اندک است. بدلیل جایگاه لیلیوم در بازار داخلی و خارجی و ارزش این گیاه زینتی

استفاده از کشت بافت برای تکثیر گونه‌های لیلیوم از اواخر دهه 1950 شروع شد و بلافاصله پس از آن تحقیقات زیادی در زمینه توسعه کشت بافت این گیاه انجام شد. بافت‌های لیلیوم عموماً توانایی بالایی برای باززایی دارند اما بیشتر از پیاز به عنوان ریزنمونه برای تکثیر استفاده می‌شود (16). در حال حاضر اندام زایی در لیلیوم پدیده غالبی است. در ریزنمونه فلس پیاز، پیازک‌های کوچک روی بخش پایه فلس تشکیل می‌شود (5). شکل 1 تصویر شماتیکی از ریزازدیادی لیلیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای را نشان می‌دهد. با وجود مشکلات بسیار در باززایی گونه‌های موجود در جنس لیلیوم از طریق تکثیر غیرجنسی، مطالعات گسترده‌ای در مورد فناوری کشت لایه‌های سلولی نازک¹ (TCL) در شرایط درون‌شیشه‌ای، به عنوان راه‌حل مناسبی جهت برطرف کردن موانع تکثیر این گیاه انجام شده است (14). از آنجایی که کشت لایه‌های سلولی نازک بطور گسترده در بسیاری از مطالعات مورفولوژیکی موفق بوده است، از آن به عنوان یک سیستم مدل در تکثیر گیاهان در نظر گرفته می‌شود. در این روش برش‌های نازکی از بافت اپیدرمی به همراه تعداد کمی از لایه‌های سلولی پیرامون آن به عنوان ریزنمونه در نظر گرفته می‌شود. دارا بودن اندازه کوچک ریزنمونه (از چند میکرومتر تا چندین میلی‌متر بسته به نوع اندام) موجب میانکنش کمتر بین سلول‌ها می‌شود. از این‌رو کاربرد این روش در شرایط درون‌شیشه‌ای بدلیل قرار گرفتن

2ip و TDZ) با غلظت 1 میلی گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی گرم در لیتر NAA و 3 درصد ساکارز و 8 گرم در لیتر آگارکشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. هر دو هفته یکبار ریزنمونه‌ها واکشت شده و به محیط کشت جدید با ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی مشابه با محیط کشت اولیه منتقل شدند. در این آزمایش اثر نوع سیتوکینین، رقم و اثر متقابل هر دو عامل بر گیاهچه‌های تولید شده با بررسی صفاتی مانند درصد اندام زایی دو ماه پس از کشت و تعداد پیازک، تعداد ریشه، طول گیاهچه، درصد ریشه‌زایی و وزن خشک 4 ماه بعد از کشت ارزیابی شد.

سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده: گیاهچه‌های باززایی شده به لیوان‌های یکبار مصرف حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت 1:1 منتقل شدند. به عنوان تأمین رطوبت لازم جهت حفظ و نگهداری گیاهچه‌ها از لیوان یکبار مصرف شفاف به عنوان درپوش استفاده شد. به منظور زهکشی مناسب و سازگاری بهتر گیاهچه‌ها، سوراخ‌هایی در انتهای لیوان‌ها ایجاد شد. پس از یک ماه به منظور سازگاری بهتر گیاهچه‌ها با شرایط محیطی، درپوش‌ها برداشته شد. گیاهچه‌های شاداب پس از 45 روز به گلدان انتقال داده شده و در شرایط دمایی و رطوبتی گلخانه نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری JMP8 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد ارزیابی شده و نمودارها با استفاده از برنامه Excell رسم شدند. تبدیل داده‌های درصدی با استفاده از arcsin انجام شد و سپس تجزیه واریانس با داده‌های تبدیل شده صورت گرفت.

نتایج و بحث

بررسی نوع سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر اندام‌زایی لیلیوم

بررسی تأثیر سیتوکینین‌های مختلف (BA، 2ip و Kin) بر پارامترهای باززایی نشان داد که بیشترین درصد اندام‌زایی (85 درصد) در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی BA بدست آمد که با 2ip تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین درصد باززایی (51/77 درصد) در تیمارهای حاوی Kin مشاهده شد (جدول 1). تحقیقات انجام شده نیز بیانگر تأثیر زیاد تنظیم کننده رشد گیاهی BA بر درصد باززایی ریزنمونه‌های لیلیوم است (3، 8 و 20). همچنین شمارش تعداد برگ گیاهچه‌های باززا شده، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تنظیم کننده های رشد گیاهی مختلف بود. بطوری‌که گیاهان باززا شده در محیط کشت حاوی BA بیشترین تعداد برگ را

و نیز واردات پیاز آن از خارج از کشور، انجام تحقیقات منسجم برای ریزازدیادی این گیاه را ضروری می‌سازد. از اینرو در این پژوهش سعی بر این است تا با بررسی و مطالعه باززایی این گیاه، بهترین پروتکل را برای تولید پیازک از ریزنمونه‌های فلس پیاز لیلیوم و با استفاده از ارقام و محیط کشت‌های متفاوت با استفاده از روش کشت لایه‌های سلولی نازک تعیین کرد. نتایج این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر در تولید انبوه و تجاری این گیاه با استفاده از روش TCL در کشور باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و ضدعفونی ریزنمونه‌ها: به منظور شکستن خواب پیاز، پیازهای تازه تهیه شده ارقام Robina، Donato، Nymph، Lessoto و Roxana از یکی از تولید کنندگان گل لیلیوم در شهر مشهد خریداری شد و پیازها به مدت یک ماه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور ضدعفونی سطحی، فلس‌های پیازهای 5 رقم لیلیوم ذکر شده پس از نیم ساعت قرار گرفتن زیر آب جاری به مدت 15 دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم 2 درصد و پس از آن به مدت 15 دقیقه با محلول کلرید جیوه 0/1 درصد تیمار شدند. شستشوی نهایی فلس‌ها با استفاده از آب مقطر استریل و در زیر هود لامینار انجام شد. بطوری‌که فلس‌های مربوط به هر یک از ارقام، 3 مرتبه به مدت 10 دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

مطالعه اثر نوع سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر

اندام‌زایی: به منظور بررسی نوع سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر اندام‌زایی پیاز لیلیوم رقم Robina، به عنوان یک رقم تجاری که تعداد فلس زیاد و مناسبی برای کشت فراهم می‌کند، از لایه‌های سلولی نازک فلس‌ها (TCL) به عنوان ریزنمونه استفاده شد. بدین منظور فلس‌ها با ضخامت 1، 3 و 5 میلی‌متر برش خورده و در محیط کشت MS حاوی ترکیب‌های هورمونی BA، 2ip و Kin با غلظت 1 میلی گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی گرم در لیتر NAA و 3 درصد ساکارز و 8 گرم در لیتر آگار کشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای $25 \pm$ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در این آزمایش ارزیابی صفاتی مانند درصد اندام‌زایی، 2 ماه پس از کشت و تعداد پیازک، تعداد ریشه، تعداد برگ، ارتفاع گیاهچه و وزن خشک گیاهچه بعد از 4 ماه از کشت صورت گرفت.

بررسی نوع و ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی و رقم

بر باززایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم: به منظور بررسی اثر نوع سیتوکینین بر باززایی ارقام مختلف، از پنج رقم Robina، Nymph، Donato، Lessoto و Roxana استفاده شد. بهترین اندازه ریزنمونه بر اساس نتایج آزمایش اول انتخاب شد و ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی مختلف (BA، Kin،

میزان تولید ریشه در حضور BA مشاهده شد (جدول 1). در آزمایشی که به منظور بررسی اثر نوع سیتوکینین و اکسین بر باززایی گیاه لیلیوم (*lilium longiflorum*) انجام شد، گزارش شد که استفاده از BA سبب تمایز فلس پیاز شده و تشکیل پیازک را تحریک کرد اما مانع تشکیل ریشه شد (15). اندازه گیری وزن خشک گیاهچه های رشد یافته در حضور تنظیم کننده های رشد گیاهی BA، 2ip و Kin نشان داد که که بیشترین وزن خشک گیاهچه ها (0/17 گرم) در محیط کشت حاوی BA بدست آمد که با Kin تفاوت معنی داری نداشت و کمترین وزن خشک (0/11 گرم) در تیمارهای حاوی 2ip مشاهده شد.

داشتند. بر خلاف تعداد برگ، ارتفاع گیاهچه ها، تحت تأثیر هورمون های مختلف قرار نگرفت، بطوری که ارتفاع گیاهچه ها در محیط کشت حاوی هر یک از سه نوع تنظیم کننده رشد گیاهی BA، 2ip و Kin تفاوت معنی داری نداشت. این امر نشان می دهد که افزایش طول برگ گیاهچه های باززا شده لیلیوم تحت تأثیر نوع تنظیم کننده رشد گیاهی سیتوکینین قرار نگرفته است (جدول 1). نتایج حاصل از اندازه گیری تعداد پیازک و تعداد ریشه در محیط کشت های حاوی سه نوع تنظیم کننده رشد گیاهی BA، 2ip و Kin نشان داد که از نظر تولید پیازک بین آن ها تفاوت معنی داری وجود ندارد اما بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی 2ip و کمترین

جدول 1- اثر نوع سیتوکینین بر شاخص های باززایی ریزنمونه TCL گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه ای

Table 1- Effect of cytokinin on regeneration parameters of TCL explant of *Lilium* spp. under *In vitro* condition

وزن خشک	ارتفاع گیاهچه	تعداد برگ	تعداد ریشه	تعداد پیازک	اندامزایی Organogenesis (%)	
Dry weight (g)	Plantlet height (cm)	Leaf no	Root no	Bulblet no		
0.16 ab	7 a	34.22 a	6.66 b	9.88 a	85 a	تنظیم کننده رشد
0.11 b	8.5 a	18.44 b	14.66 a	9.11 a	62.77 ab	گیاهی Plant
0.17 a	9 a	19.22 b	8.88 b	8.33 a	51.77 b	growth regulator
						Kin

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test

ریشه، برگ و ارتفاع گیاهچه داشتند، بطوری که صفات فوق در ریزنمونه هایی با ضخامت 1 و 3 میلی متر با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند اما با ضخامت 5 میلی متر تفاوت معنی داری را نشان دادند (جدول 2). به نظر می رسد برهمکنش ریزنمونه با محیط کشت و قرار گرفتن در معرض هورمون ها در ریزنمونه های با ضخامت 3 میلی متر در حد مناسبی حفظ می شود که در نهایت منجر به افزایش درصد اندامزایی شده است.

در بخش دیگر این آزمایش تأثیر ضخامت ریزنمونه TCL (1، 3 و 5 میلی متر) بر اندامزایی گیاه لیلیوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اندازه های مختلف ریزنمونه بطور معنی داری، درصد اندام زایی و وزن خشک را تحت تأثیر قرار دادند. بطوری که بیشترین درصد اندامزایی (100 درصد) و وزن خشک (0/2 گرم) در ریزنمونه هایی با ضخامت 3 میلی متر مشاهده شد (جدول 2). در مورد سایر صفات نیز ریزنمونه هایی با ضخامت 3 میلی متر بیشترین تأثیر را در تولید پیازک،

جدول 2- اثر اندازه ریزنمونه بر شاخص های باززایی گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه ای

Table 2- Effect of explant size on regeneration parameters of *Lilium* spp. under *In vitro* condition

وزن خشک	ارتفاع گیاهچه	تعداد برگ	تعداد ریشه	تعداد پیازک	درصد اندامزایی Organogenesis (%)	
Dry weight (g)	Plantlet height (cm)	Leaf no	Root no	Bulblet no		
0.14b	8.83a	28.33a	10.33a	9.77a	55.22b	اندازه ریزنمونه
0.2a	10.05a	31.66a	12.44a	10.55a	100a	Explant size
0.09c	5.61b	11.88b	7.44b	7b	44.33b	(mm)

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی باشند

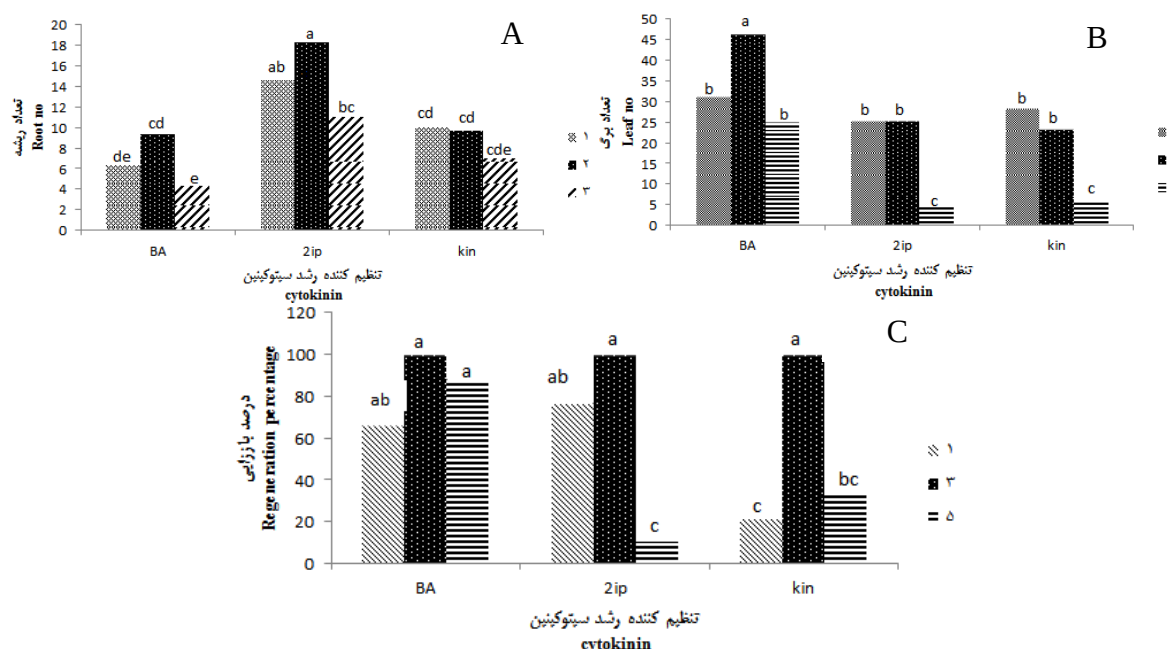
Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test

3 میلی متر در تیمار 2ip بیشترین تعداد ریشه و در محیط کشت حاوی BA بیشترین تعداد برگ را داشتند که نسبت به سایر تیمارها تفاوت

بررسی اثر متقابل ضخامت ریزنمونه (1، 3 و 5 میلی متر) و نوع سیتوکینین (BA، 2ip و Kin) نشان داد که ریزنمونه هایی با ضخامت

نشان دادند اما تفاوت معنی‌داری در درصد اندام زایی ریزنمونه‌ها با ضخامت مختلف در محیط کشت حاوی BA و 2ip مشاهده نشد (شکل 2).

معنی‌داری را نشان دادند. همچنین ریزنمونه‌های 3 میلی‌متری در تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی هر سه نوع سیتوکینین نسبت به ریزنمونه‌هایی با قطر 1 و 5 میلی‌متر بیشترین درصد اندام زایی را



شکل 2- اثر نوع تنظیم کننده رشد گیاهی سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر، (A) تعداد ریشه، (B) تعداد برگ، (C) درصد باززایی لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Figure 1- Effects of cytokinin and explant size on A) root no, B) leaf no, C) Regeneration percentage of *Lilium* spp. under *in vitro* condition.

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test

این گیاه است (7).

علاوه بر آن در بین ارقام مورد مطالعه، بیشترین تعداد پیازک در رقم Roxana بدست آمد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p \leq 0/01$) (جدول 3). تفاوت تولید پیازک ارقام مختلف گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای در بسیاری از آزمایشات به اثبات رسیده است (6، 12). اثر رقم نیز بر طول گیاهچه‌های باززا شده معنی‌دار بود ($p \leq 0/01$). طبق این نتایج، ارقام Roxana و Donato به ترتیب با 5 و 4/85 سانتی‌متر، بیشترین طول را نشان دادند (جدول 3).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های باززایی نشان داد که کاربرد چهار نوع تنظیم کننده رشد 2ip، BA، Kin و TDZ تأثیر معنی‌داری بر درصد باززایی، درصد ریشه‌زایی، طول گیاهچه، تعداد ریشه و وزن خشک گیاهچه‌ها در سطح احتمالی 5 درصد داشته است. بطوری که کاربرد تنظیم کننده رشد گیاهی BA، Kin و TDZ به ترتیب بیشترین افزایش را در وزن خشک گیاهچه‌ها، طول آن و تولید ریشه داشته است که از لحاظ آماری نسبت به سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول 4). در واقع

بررسی نوع ترکیب هورمونی و رقم بر اندام‌زایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم

با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل رقم و نوع تنظیم کننده رشد گیاهی بر اندام زایی گیاه لیلیوم در آزمایشات مختلف (7، 9) آزمایش دوم به منظور بررسی اثر نوع تنظیم کننده رشد سیتوکینین و رقم و اثر متقابل این عوامل بر یکدیگر بر شاخص‌های باززایی در این گیاه انجام شد. طبق داده‌های بدست آمده، بین ارقام مختلف از نظر شاخص‌های باززایی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p \leq 0/01$). بطوری که رقم Roxana با تعداد 8 ریشه در هر ریزنمونه و وزن خشکی معادل 0/627 گرم بیشترین تأثیر را نسبت به سایر ارقام نشان داد اما کمترین درصد اندام زایی (83/3 درصد) و ریشه‌زایی (83/3 درصد) در رقم Nymph مشاهده شد که با درصد اندام زایی و ریشه‌زایی سایر ارقام تفاوت معنی‌داری داشت (جدول 3). نوع رقم به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر شاخص‌های باززایی مشخص شده است. بطوری که تحقیقات انجام شده به منظور بررسی باززایی 3 رقم لیلیوم نشان‌دهنده تفاوت در وزن خشک گیاهچه‌های ارقام مختلف

در محیط کشت حاوی 2ip به میزان بالایی صورت گرفت که با BA و Kin تفاوتی نداشت اما TDZ بطور معنی داری گیاهچه کمتری تولید کرد (جدول 4). گزارش های ارائه شده نیز بیانگر تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر بهبود درصد اندام زایی است (6 و 17).

استفاده از BA سبب القای تولید پیازک شده که منجر به افزایش وزن خشک می شود اما مانع تشکیل ریشه خواهد شد که با نتایج نات و همکاران (15) مطابقت دارد. طبق نتایج این آزمایش، کاربرد سیتوکینین های مختلف بر صفاتی نظیر درصد باززایی مؤثر بوده است، بطوری که درصد باززایی و تولید گیاهچه در ریزنمونه های رشد یافته

جدول 3- اثر رقم بر شاخص های باززایی ریزنمونه TCL گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه ای

Table 3- Effect of cultivar on regeneration parameters of TCL explant of *Lilium* spp. under *in vitro* condition

وزن خشک Dry weight (g)	تعداد ریشه Root no	ریشه زایی Rooting (%)	طول گیاهچه Plantlet length (cm)	تعداد پیازک Bulblet no	اندام زایی Organogenesis (%)	رقم Cultivar
0.37b	5.41b	100a	3.70b	6.66a	100a	Lesoto
0.31bc	4.66b	100a	4.87a	4.75c	100a	Donato
0.62a	8a	97.16a	5a	7.66a	97.16a	Roxana
0.26c	5.25b	83.33b	3.29b	6.41ab	83.33b	Nymph
0.25c	4.66b	100a	3.45b	4.83bc	100a	Robina

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test

مشاهده نشد. این امر نشان می دهد که تولید پیازک در ریزنمونه های گیاه لیلیوم در شرایط این ویترو تحت تأثیر نوع سیتوکینین قرار نگرفته است.

با وجود گزارش های ارائه شده مبنی بر تفاوت تنظیم کننده های رشد گیاهی مختلف در تولید پیازک (17، 10، و 7)، تفاوت معنی داری در بین تیمارهای مورد بررسی در این آزمایش از لحاظ تعداد پیازک

جدول 4- اثر نوع سیتوکینین بر شاخص های باززایی ریزنمونه TCL گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه ای

Table 4- Effect of cytokinin on regeneration parameters of TCL explant of *Lilium* spp. under *in vitro* condition

وزن خشک Dry weight (g)	تعداد ریشه Root no	طول گیاهچه Plantlet length (cm)	اندام زایی Organogenesis (%)	تنظیم کننده رشد گیاهی plant growth regulator
0.27b	6.66a	4.06b	91.06b	TDZ
0.33b	5.46b	4.16b	100a	2ip
0.53a	4.8b	3.1c	100a	BA
0.32b	5.46b	4.93a	93.33ab	Kin

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test

بطوری که ریزنمونه های حاصل از رقم Nymph در حضور هورمون BA بیشترین پیازک را تولید کردند (جدول 5). مقایسه وزن خشک در تیمارهای مختلف نشان داد که وزن خشک گیاهچه های حاصل از ریزنمونه های رقم Roxana در محیط کشت حاوی هورمون BA، بیشترین مقدار بود ($p \leq 0.01$) (جدول 5). در تحقیقی توانایی باززایی ارقام اورینتال گیاه لیلیوم (*Lilium* spp.) مورد مقایسه قرار گرفت. طبق نتایج این آزمایش، بیشترین درصد تشکیل پیازک (84 درصد) در رقم Aubade در محیط کشت حاوی 0/5 میلی گرم در لیتر BA مشاهده شد. همچنین در این رقم وزن پیازک 6/7 افزایش یافته بود که نسبت به سایر ارقام بیشتر بود (9).

نتایج تجزیه واریانس داده های این آزمایش نشان داد که اثر متقابل رقم و نوع سیتوکینین بر درصد باززایی، تعداد پیازک و درصد ریشه زایی، طول گیاهچه، تعداد ریشه و وزن خشک گیاهچه در سطح احتمال 5 درصد معنی دار بود. بررسی درصد باززایی و ریشه زایی در ریزنمونه ها نشان داد که ارقام و هورمون های مختلف بر میزان باززایی و ریشه زایی مؤثر بوده است، بطوری که رقم Nymph در حضور هورمون TDZ و Kin نسبت به سایر ارقام و هورمون ها کمترین باززایی و ریشه زایی را نشان داد (جدول 5). بر خلاف نوع تنظیم کننده رشد گیاهی مورد استفاده که به تنهایی تأثیر معنی داری در تولید پیازک نداشت، اما اثر متقابل نوع تنظیم کننده رشد گیاهی و رقم موجب تفاوت در تولید پیازک در ریزنمونه های گیاه لیلیوم شد،

جدول 5- اثر متقابل رقم و نوع هورمون بر خصوصیات رشدی گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای

 Table 5- Interaction of cultivar and cytokinin on growth characteristics of *Lilium* spp. under *in vitro* condition

رقم گیاه Cultivar	هورمون Hormon	اندام‌زایی Organogenesis (%)	تعداد پیاک Bulblet no	طول گیاهچه Platlet length (cm)	ریشه‌زایی Rooting (%)	تعداد ریشه Root no	وزن خشک Dry weight (g)
Lesoto	TDZ	100a	6bcde	4abcd	100a	6de	0.263def
	2ip	100a	8abcd	4abcd	100a	5.66de	0.28def
	BA	100a	5.66 cde	1.83efg	100a	3.66fg	0.643b
	kin	100a	7bcde	5ab	100a	6.33cde	0.326cdef
Donato	TDZ	100a	5de	5ab	100a	6.66bcd	0.323cdef
	2ip	100a	6bcde	5.66a	100a	5def	0.24def
	BA	100a	4e	3.16cdef	100a	1h	0.21def
	kin	100a	4e	5.66a	100a	6de	0.366cdef
Roxana	TDZ	88.66a	6bcde	4abcd	88.66a	9a	0.29def
	2ip	100a	7bcde	4.66abc	100a	6.66bcd	0.54bc
	BA	100a	9ab	5.66a	100a	8.33ab	1.226a
	kin	100a	8.66abc	5.66a	100a	8abc	0.453bcd
Nymph	TDZ	66.66b	4e	4.66abc	66.66b	5.33def	0.216ef
	2ip	100a	6.66bcde	1.5fg	100a	5def	0.433bcde
	BA	100a	10.66a	3.66bcd	100a	6de	0.173f
	kin	66.66b	4.33e	3.33bcde	66.66b	4.66ef	0.246def
Robina	TDZ	100a	4e	2.66defg	100a	6.33cde	0.3def
	2ip	100a	6bcde	5ab	100a	5def	0.203f
	BA	100a	4.33e	1.16g	100a	5def	0.3def
	kin	100a	5de	5ab	100a	2.33gh	0.223ef

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test

نتیجه‌گیری کلی

گیاه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد که به عنوان روشی مؤثر در باززایی و تولید گیاه لیلیوم تلقی می‌شود. با استفاده از این روش و بررسی پارامترهایی مانند تنظیم کننده‌های رشد، ضخامت ریزنمونه و نوع رقم مورد استفاده می‌توان به شرایط مناسب برای باززایی این گیاه دست یافت. بطوری‌که بهترین محیط کشت برای باززایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم با ضخامت 3 میلی‌متر، محیط کشت MS حاوی 1 میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA در نظر گرفته شد.

در سال‌های اخیر به دلیل محدودیت‌های تکثیر سنتی گیاه لیلیوم بویژه گسترش انتقال بیماری‌ها و استقبال بسیار زیاد از این گیاه و همچنین خروج مبالغ زیاد ارز جهت واردات پیاز لیلیوم سبب شده است تا کشت بافت این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار شود. لذا ضرورت تحقیق و توسعه روش مناسب جهت ریزازدیادی و کشت بافت این گیاه در داخل کشور احساس می‌شود. در این آزمایش بطور موفقیت‌آمیزی از ریزنمونه‌های TCL پیاز لیلیوم جهت باززایی این

منابع

- 1- Anderson N.O. 2007. Flower Breeding & Genetics (Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century). Springer Science & Business Media, Netherlands.
- 2- Azadi P., and Mojtahedi N. 2009. Effect of growth regulators, sucrose concentration and scale segment on micropropagation of *Lilium ledebourii* in winter harvest bulbs. In *Agronomy and Horticulture*.
- 3- Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., and Scardof F. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stemnodes of lilium. *Plant Cell Tissue Culture*, 74: 37-44.
- 4- Bui V. L., Nhut D. T., and Tran Thanh Van K. 1999. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum* *in vitro*. *Comptes Rendus Acadmic Science Paris*, 322:303-310.
- 5- Hohtola A., Haggman H., Bach A., and Tahvonon R. 2005. Biotechnological Approaches in Lily (*Lilium*) Production. Oulu University Press.
- 6- Kapoor R., Kumar S., and Kanwar J. K. 2008. Bulblet production from node explants grown *in vitro* in hybrid

- lilies. International Journal of Plant Production, 3: 125- 134.
- 7- Khanghaei L. 2013. Study of explants position, culture medium type and plant growth regulators effects on liliuim's bulbs (Oriental and OT Hybrids) regeneration In Vitro. Master's thesis, Islamic Azad University of Mashhad. (in Persian with English abstract)
- 8- Kumar S., Awashthi V., and Kanwar J.K. 2007. Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental lily. Horticultural Science, 34:77-83.
- 9- Lojic M., Vinterhalter B., Subotic A., and Vinterhalter D. 2015. Differences in regenerative capacity of Oriental lily (*Lilium* spp.) cultivars. Botanica Serbica, 39:159-167.
- 10- Mengli X., Sun L., Qiu Sh., Liu J., and Xu J. 2012. *In vitro* mutagenesis and identification of mutant via ISSR in lily (*Lilium lingiflorum*). Plant Cell Reports, 31: 1043-1051.
- 11- Mirmasoumi M., Azadi P., Sharafi A., Ntui V.O., and Mii M. 2013. Simple protocol for plant regeneration of *Lilium ledebourii* using transverse thin cell layer. Progress in Biological Sciences, 3: 117-122.
- 12- Mojtahedi N., and Azadi P. 2009. Comparision of *in vitro* bulblet production in two comercial *lilium* cultivars, *lilium longiflorum* cv. Gironde and *lilium longiflorum* cv. Cassandra. Journal of seed, 24: 721-738 (in persian).
- 13- Nhut D.T., Van Le B., Fukai S., Tanaka M., and Van K.T.T. 2001a. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation, 33:59-65.
- 14- Nhut D.T., Le B.V., Teixeira Da Silva J.A., and Aswath C. R. 2001b. Thin cell layer culture system in lilium: regeneration and transformation Perspectives. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant, 37:516-523.
- 15- Nhut D.T., Van Le B., Tran Thanh Van K. 2003. Manipulation of morphogenetic pathways of *lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plants, 37: 44-49.
- 16- Niimi Y., Han D.S., and Makoto F.2001. Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium* x 'Enchantment'. Scientia Hortic, 90: 325-334.
- 17- Paric A., Cakar J., Muratovic E., and Kralija B. 2011. Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *lilium bosnicum* (G. Beck) ex Fritsch. Botanica Serbica, 35:31-35.
- 18- Thakur R., Sood A., and Nagar P. 2006. Regulation of growth of *lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. Plant Cell Reports, 25: 382-391.
- 19- Teixeira da Silva J.A. 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology, 12: 683-691.
- 20- Van Tuyl J.M., and Van Holsteijn H.M.C. 1996. Lily breeding research in the Netherlands. Acta Horticulture, 414: 35-46.



Effect of Cultivar and Plant Growth Regulators on *In vitro* Regeneration of *Lilium* Spp. Utilizing Thin Cell Layer Explants

A. Sharifi^{1*} - F. Keykha Akhar² - M. Yazdi³ - A. Bagheri⁴

Received: 19-06-2016

Accepted: 30-06-2017

Introduction: Lily (*Lilium* spp.) is a genus of herbaceous flowering plants, which consisted of many beautiful ornamental species with large prominent flowers. Most species are native to the Northern hemisphere temperate, though their range extends into the Northern subtropics. Some specific hybrids of *Lilium* spp. have been developed as cut flower in controlled conditions and in some cases can be grown as pot plant. Propagation rate of lily in natural clonal propagation methods is very low and one year produces of 1-2 bulblets per bulb scale. There is also possibility of disease transmission; so that, tissue culture techniques has provided an efficient method for its micropropagation.

Materials and Methods: In this study, two separate experiments under *In vitro* conditions the bulblet regeneration from thin cell layer (TCL) explants of *Lilium* spp. was investigated. In the first experiment, after two months the effect of TCL explants with 1, 3 and 5 mm thickness on MS medium containing 1 mg/l BA, 2ip and kin in combination with 0.5 mg/l NAA on regeneration parameters were assayed. In the second experiment to determine the effect of cultivar and cytokinin types, 3mm thickness TCL explants of five cultivars (Robina, Donato, Nymph, Lessoto and Roxana) were tested on MS medium containing different plant growth regulator (PGR) compounds including BA, kin, 2ip and TDZ at concentration of 1 mg/l in combination with 0.5 mg/l NAA. The regeneration parameters were assayed after four months. In all experiments, the medium was adjusted to pH 5.8 and autoclaved at 121°C for 15 min. All cultures were incubated at 25 ± 2°C with a 16 h photoperiod under cool white fluorescent lights (30 µmol/m²).

Results and Discussion: According to the first experiment results, plant growth regulator of BA in all of surveyed parameters except root number was better than other PGRs and explants with 3 mm thickness was the best in all of parameters. The interaction of PGR and explants was significant, however maximum bulblet regeneration was observed in TCL explants with 3 mm thickness in all of PGR treatments (100%). While 1 mm thickness TCL in 2ip and 1 and 5 mm thickness TCL in Kin had the least regeneration percentage. Results revealed that the interaction of explants and medium is a key factor for suitable establishment, regeneration and growth of TCLs. Bulb dormancy is one of the limiting factors in regeneration of bulbous crop species. It seems under *In vitro* condition explants size and PGR combination of media especially cytokinin affected on breaking of dormancy. Maximum number of leaves and dry weight of bulblets in medium containing BA was significantly higher compared with other treatments. Most of studies confirmed the positive effect of BA on regeneration of lily. The function of cytokinin in plant promoted cell division and differentiation, which lead to growth and maintaining cells in meristematic status.

Result of second experiment showed that cultivar was one of the effective factors on regeneration trait. Oriental lily cultivar "Roxana" had the highest number of roots, bulblets, dry weight and length of plantlets and "Nymph" cultivar showed the lowest percentage of regeneration, dry weight, length of plantlets and rooting obtained. In all of cultivars BA induced more organogenesis percentage and plantlet dry weight, while TDZ induced more rooting percentage. The interaction of cultivar and PGR treatments on percentage of regenerated bulblets and rooting were significant. "Nymph" cultivar had minimum percentage of regeneration and rooting in medium containing TDZ and Kin. Furthermore, "Roxana" cultivar in medium containing BA showed the best dry weight comparison to other treatments.

Conclusion Lily has widely used in the floral industry as a cut flower or potted plant. In recent years, tissue culture was developed as reliable and highly effective method to overcome its limitations of vegetative propagation. The most advantage of this method is high multiplication rate and disease free propagation. In this

1 and 2- Assistant Professors, Ornamental Plant Biotechnology Department, Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Khorasan Razavi

(*- Corresponding Author Email: ahmadsharifi66@yahoo.com)

3 and 4- PhD Student of Agricultural Biotechnology and Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad

study, bulblet regeneration of *lilium* Spp. from TCL explants under *in vitro* condition was considered as a highly efficient procedure for its micropropagation. With optimization of TCL system some parameters such as exogenously applied plant growth regulators, cultivar, explants types were investigated. Favorable conditions for bulblet regeneration were achieved with 3 mm thickness TCLs in MS medium containing 1 mg/l BA with 0.5 mg/l NAA. This protocol can be used for rapid micropropagation of many cultivars.

Keywords: Auxin, Bulb explant, Cytokinin, *In vitro* culture, Micropropagation



تأثیر فورکلرنورون بر پیازچه‌زایی، ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی موسیر (*Allium hirtifolium*)

نسرین فرهادی¹ - سعیده علیزاده سالطه^{2*}

تاریخ دریافت: 1395/05/06

تاریخ پذیرش: 1395/12/03

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر پیش تیمار و محلول‌پاشی فورکلرنورون روی پیازچه‌زایی، ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی پیاز موسیر اجرا گردید. پیش تیمار پیازها از طریق غوطه‌ور سازی آن‌ها در غلظت‌های مختلف فورکلرنورون (0، 5 و 10 میلی گرم در لیتر) به مدت 24 ساعت انجام شد، همچنین محلول‌پاشی با چهار غلظت فورکلرنورون (0، 50، 100 و 150 میلی گرم در لیتر) دو، چهار و شش هفته پس از کاشت صورت گرفت. پیش تیمار و محلول‌پاشی با فورکلرنورون به‌طور معنی‌داری تعداد برگ در هر بوته، وزن تر و وزن خشک پیازها را نسبت به نمونه شاهد افزایش دادند، ولی تعداد پیازچه‌های تولیدی تحت تأثیر تیمارها تغییری نشان نداد. مقدار آلکسین پیازهای موسیر تحت تأثیر تیمارهای مورد بررسی تغییر معنی‌داری نداشت و به‌طور متوسط مقدار آن 0/859 میلی گرم در هر گرم بافت تازه پیاز بود. تیمار با فورکلرنورون سبب افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل پیازها گردید و بیشترین مقدار آن (1/585 میلی گرم گالیک اسید در هر گرم بافت تازه پیاز) در پیش تیمار 5 میلی گرم در لیتر و محلول‌پاشی 100 میلی گرم در لیتر فورکلرنورون به‌دست آمد. فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر تیمارهای مختلف فورکلرنورون افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان دادند. افزایش مقدار فنل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیازهای موسیر تیمار شده گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، پیش تیمار 10 میلی گرم در لیتر همراه با محلول‌پاشی 100 میلی گرم در لیتر با فورکلرنورون می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش عملکرد و کیفیت پیازهای موسیر از طریق افزایش وزن و خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: آلکسین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پیازچه، پیش تیمار، سیتوکینین، محلول‌پاشی

مقدمه

Alliaceae است که از گیاهان بومی و با ارزش ایران بوده و به‌صورت وحشی در مراتع و دامنه رشته کوه زاگرس می‌روید (10). موسیر در صنایع غذایی و دارویی کاربرد گسترده‌ای دارد، برگ‌ها و پیازهای توپر قسمت‌های خوراکی گیاه می‌باشند که در بسیاری از مناطق کشور به‌صورت خشک شده و یا تازه به عنوان سبزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیاز موسیر منبع غنی از ویتامین‌ها، عناصر معدنی و اسیدهای چرب ضروری می‌باشد (12) و به سبب داشتن مقادیر بالایی از ترکیبات گوگردی، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد توموری است (16 و 27). متأسفانه به دلیل بهره‌برداری‌های بی‌رویه و برداشت نادرست در بسیاری از مراتع، تراکم گیاه موسیر در واحد سطح به شدت کاهش یافته است و جزء گونه‌های در خطر انقراض قرار دارد (3).

موسیر به‌طور معمول با کشت پیازچه تکثیر می‌شود، اما سرعت تکثیر از این طریق بسیار پایین می‌باشد. از طرف دیگر بذرهای این گیاه دارای خواب فیزیکی و فیزیولوژیکی می‌باشند (11) و در صورت

گیاهان دارویی به علت ماهیت طبیعی و داشتن ترکیبات همولوگ دارویی در کنار هم معمولاً فاقد عوارض ناخواسته هستند، به همین دلیل در حال حاضر از اهمیت خاصی در تأمین سلامت جوامع از نظر پیشگیری و درمان بیماری‌ها برخوردار می‌باشند. ایران شرایط بسیار مطلوبی از نظر آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی برای رشد بسیاری از گیاهان دارویی دارد. آب و هوای متفاوت در قسمت‌های مختلف ایران سبب تنوع گیاهی فراوان و رویش گیاهان مهم و باارزشی شده است که برخی از آن‌ها تنها بومی ایران هستند (24). موسیر با نام علمی *Allium hirtifolium* Boiss. گیاهی چند ساله از خانواده

1 و 2- دکتری علوم باغبانی و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(Email: alizadeh@tabrizu.ac.ir

*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.56997

جوانه‌زنی به 2-3 سال نیاز دارند تا از نظر اقتصادی سوخ قابل برداشت تولید کنند (3). وجود مشکلات مزبور در تکثیر این گیاه انجام مطالعات اصلاحی و ژنتیکی در مورد موسیر را با محدودیت مواجه نموده است و تحقیقات در مورد اصلاح این گیاه تنها به چند مورد بررسی تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی توده‌های بومی موجود محدود می‌شود (10، 4 و 15). بنابراین در حال حاضر مهم‌ترین مسئله در بحث اهلی سازی و گسترش کشت گیاه موسیر، افزایش راندمان تکثیر آن می‌باشد که مواد گیاهی کافی برای انجام برنامه‌های اصلاحی را فراهم آورده تا بتوان از طریق مطالعات بیوتکنولوژی و دستیابی به ارقام برتر، علاوه بر حفظ بقای این گیاه با ارزش، کشت آن را گسترش داد.

از موارد مهمی که در کشت و کار گیاهان پیازدار از اهمیت بالایی برخوردار است، تعداد پیازهای دختری تولید شده می‌باشد و عواملی که بتوانند پیازدهی را تحریک کرده و آن را افزایش دهند، ارزش زیادی دارند. در مورد تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی روی رشد و نمو گیاهان پیازی مطالعات اندکی صورت گرفته است. بررسی‌ها نشان می‌دهند تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نظیر سایتوکینین‌ها می‌توانند پیازچه‌دهی و رشد پیازها را بهبود بخشند (29). فورکلرفنورون با نام آیوپاک 1-(2-کلرو-4-پیریدیل)-3-فنیل اوره (CPPU)¹ توسط برگ، ساقه، کوتیلدون و بذور جوانه‌زده قابل جذب می‌باشد. این ترکیب در تحریک تقسیم سلولی، رشد و نمو، کاهش غالبیت انتهایی، شکستن خواب جوانه‌های جانبی و آغاز جوانه‌زنی، به تأخیر انداختن مرحله پیری و افزایش دوام کلروپلاست در برگ‌ها مؤثر می‌باشد (19). فعالیت سیتوکینینی CPPU، 10000 بار بیشتر از فعالیت سیتوکینینی دی فنیل اوره و 10 برابر بیشتر از فعالیت سیتوکینینی کینتین است (28). استفاده از این ترکیب علاوه بر افزایش کمیت باعث افزایش کیفیت محصولاتی مانند انگور، کیوی، هندوانه، کدو و غیره گردیده است (21 و 25).

با توجه به اثرات بیولوژیکی سیتوکینین‌ها انتظار می‌رود پیش تیمار و محلول پاشی موسیر با فورکلرفنورون سبب تحریک تقسیمات سلولی و افزایش تعداد سلول‌ها شده و در نتیجه تعداد و وزن پیازچه‌ها را افزایش دهد. بنابراین این تحقیق با هدف بررسی تأثیر پیش تیمار و محلول پاشی با سیتوکینین فورکلرفنورون بر پیازچه‌زایی، ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی پیاز موسیر انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال 1394-1395 در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی، دانشگاه تبریز انجام گرفت. در طول فصل رویش (اردیبهشت

و خرداد ماه) پیازهای موسیر از رویشگاه‌های طبیعی این گیاه در استان همدان جمع‌آوری و پس از ضد عفونی با قارچ کش کاپتان به غلظت 2 در هزار، برای رفع خواب پیازها و تحریک جوانه‌زنی به مدت دو ماه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با اندازه گیری وزن پیازها، تعداد کافی پیاز یکنواخت و یک دست انتخاب و به گلخانه منتقل گردید. پیازها در گلدان‌های حاوی پرلیت و ورمی‌کمپوست با نسبت سه به یک در عمق 10 سانتی متری با سه تکرار کشت شدند. تیمارهای این آزمایش شامل پیش تیمار با غلظت‌های مختلف فورکلرفنورون (0، 5 و 10 میلی گرم در لیتر) و محلول پاشی با چهار غلظت فورکلرفنورون (0، 50، 100 و 150 میلی گرم در لیتر) می‌باشند. پیش تیمار پیازها از طریق غوطه‌ور سازی پیازها به مدت 24 ساعت در محلول‌های تهیه شده همراه با هوادهی انجام شد. همچنین محلول پاشی دو، چهار و شش هفته پس از کاشت بر روی بوته‌ها صورت گرفت. تمامی عملیات زراعی مطابق با نیازهای اکولوژیکی موسیر به‌طور یکسان برای همه گلدان‌ها اجرا شد. در انتهای فصل رشد (شروع زرد شدن برگ‌های بوته‌ها) تعداد برگ در هر بوته ثبت گردید، سپس پیازها از داخل گلدان خارج و وزن هر یک جداگانه اندازه‌گیری و تعداد پیازچه در هر بوته نیز یادداشت شد. پیازچه‌های برداشت شده از هر تیمار با استفاده از ازت مایع منجمد و تا زمان اندازه‌گیری صفات در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. صفات بیوشیمیایی به شرح ذیل با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند:

ترکیبات فیتوشیمیایی

فنل کل: فنل کل هر نمونه با استفاده از روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری گردید (32). عصاره متانولی یک گرم بافت پیاز با استفاده از 10 سی سی حلال متانول/کلریدریک اسید 1:99 (v/v) تهیه شد و سپس به مدت بیست دقیقه در 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. به 200 میکرولیتر از عصاره متانولی هر نمونه، 300 میکرولیتر آب مقطر و 2/5 سی سی محلول فولین سیوکالتو 10 درصد اضافه گردید و پس از سه دقیقه، 2/5 سی سی کربنات سدیم 7/5 درصد به آن اضافه شد. پس از سی دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی، جذب محلول واکنش در طول موج 760 نانومتر قرائت گردید. همزمان با انجام آزمایش، رقت‌های مختلف اسید گالیک تهیه و مانند روش فوق جذب آن‌ها ثبت و منحنی استاندارد تهیه شد. مقدار فنل کل هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم گالیک اسید در هر گرم بافت تازه محاسبه شد.

آلیسین: مقدار آلیسین نمونه‌های موسیر بر اساس روش اسپکتروفتومتری با استفاده از ترکیب 4-مرکاپتوپیریدین و کاهش جذب در طول موج 324 نانومتر اندازه‌گیری گردید (22).

آنزیمی، 200 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار، 300 میکرولیتر متیونین 12 میلی‌مولار، 300 میکرولیتر نیتروبلوترازولیوم 75 میکرومولار و 1000 میکرولیتر کربنات سدیم 50 میلی‌مولار اضافه گردید. محلول واکنش در فاصله 30 سانتی‌متری از یک منبع نوری 40 وات قرار داده شد تا واکنش آغاز گردد. پس از 15 دقیقه جذب نمونه‌ها قرائت شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

این پارامتر با استفاده از ترکیب DPPH^1 ارزیابی شد (8). جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها از عصاره متانولی تهیه شده برای اندازه‌گیری فنل استفاده گردید. 1975 میکرولیتر از محلول متانولی DPPH (40 میلی‌گرم در لیتر) در داخل کووت ریخته و جذب آن در طول موج 515 نانومتر قرائت شد، سپس 25 میکرولیتر از عصاره متانولی هر نمونه به آن اضافه و پس از 30 دقیقه نگهداری در تاریکی و دمای اتاق مجدداً جذب آن قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر عصاره با استفاده از روش زیر محاسبه گردید:

$$AA = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad (1) \text{ معادله}$$

AA: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، A_B : جذب عصاره متانولی DPPH بدون نمونه، A_A : جذب عصاره متانولی DPPH پس از اضافه نمودن نمونه

این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد توسط نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تأثیر معنی‌دار پیش تیمار و محلول‌پاشی سیتوکینین فورکلر فنورون بر صفات مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی موسیر را نشان می‌دهد (جدول 1). بر اساس نتایج به‌دست آمده تیمارهای مورد مطالعه تأثیری بر پیازچه‌زایی موسیر نداشتند، ولی تعداد برگ در هر بوته، وزن تر و وزن خشک پیاز موسیر به طور معنی‌داری تحت تأثیر پیش تیمار و محلول‌پاشی فورکلر فنورون افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان دادند (جدول 2). با توجه به نقش تنظیم‌کننده‌های رشد در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان، در حال حاضر استفاده از این ترکیبات برای افزایش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی، یک تکنیک زراعی محسوب می‌شود. سیتوکینین‌ها از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشند که رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (25 و 31).

پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش پروتئین و فعالیت آنزیمی نمونه‌ها، یک گرم از بافت پیاز در هاون چینی با ازت مایع پودر و سپس با 10 سی سی بافر فسفات پتاسیم ($\text{pH}=6/8$) ساییده شد. مخلوط حاصل به مدت 20 دقیقه با 12000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و سپس محلول‌رویی به عنوان عصاره خام آنزیمی جدا و با استفاده از آن سنجش‌های مربوطه انجام شد.

پروتئین کل: برای سنجش پروتئین کل عصاره‌ها از روش برادفورد و آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده گردید (7).

کاتالاز: طبق روش ابی (2) فعالیت آنزیم کاتالاز تعیین شد. مخلوط واکنش شامل 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی، 500 میکرولیتر پراکسید هیدروژن 10 میلی‌مولار و 2450 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار بود. کاهش جذب در مخلوط واکنش در طول موج 240 نانومتر به مدت 60 ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میلی‌مول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در هر میلی‌گرم پروتئین در واحد دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن ($39/4 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) بیان گردید.

پراکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس تشکیل تتراگایاکول از گایاکول انجام شد (9). برای سنجش فعالیت آنزیم، 200 میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط شامل 1000 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم 100 میلی‌مولار و 500 میکرولیتر محلول گایاکول 20 میلی‌مولار اضافه گردید. پس از اضافه نمودن 300 میکرولیتر پراکسید هیدروژن 10 میلی‌مولار، تغییرات جذب در طول موج 470 نانومتر به مدت 90 ثانیه ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی تتراگایاکول ($26/6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) محاسبه گردید.

آسکوربات پراکسیداز: به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش ناکانو و آسادا (23) استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم با اضافه نمودن 100 میکرولیتر پراکسید هیدروژن 100 میلی‌مولار به مخلوط واکنش شامل 680 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم 100 میلی‌مولار، 100 میکرولیتر آسکوربیک اسید 10 میلی‌مولار، 100 میکرولیتر EDTA 10 میلی‌مولار و 20 میکرولیتر عصاره آنزیمی انجام گردید. کاهش در جذب مخلوط واکنش در طول موج 290 نانومتر به مدت 120 ثانیه ثبت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میلی‌مول آسکوربات اکسید شده در هر میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ گزارش گردید.

سوپر اکسید دیسموتاز: فعالیت این آنزیم بر اساس سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوترازولیوم در طول موج 560 نانومتر اندازه‌گیری شد (17). برای سنجش فعالیت آنزیم 30 میکرولیتر ربیوفلاوین 1 میکرومولار به محلول واکنش شامل 300 میکرولیتر عصاره

جدول 1- تجزیه واریانس تأثیر پیش تیمار و محلول پاشی فورکلورفنورون بر صفات مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و آنتی اکسیدانی موسیر (A. hirtifolium)

Table 1- ANOVA of effects of pretreatment and spray with forchlorfenuron on morphological, phytochemical and antioxidant characters of Persian shallot (A. hirtifolium)

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد برگ Leaf number	وزن تر پیاز Fresh weight	وزن خشک پیاز Dry weight	پروتئین Protein	فنل کل Total phenol	آلیسین Allicin	فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase
پیش تیمار Pretreatment	2	3.761**	5.631*	4.559**	3.329**	0.174ns	149.778ns	6.918*	13.809**	448.223**	272.565**	0.009ns
محلول پاشی Spray	3	1.528ns	4.518**	0.488**	0.216**	0.303**	195.333ns	13.293**	4.498*	152.385*	7.284**	2.917ns
پیش تیمار × محلول پاشی Pretreatment × Spray	6	0.461ns	1.797ns	0.097*	0.119*	0.418**	72.44ns	0.427ns	2.921ns	111.330*	2.723**	1.167ns
اشتباه آزمایشی Experimental Error	24	0.704	2.21	0.046	0.049	0.030	98.33	2.640	1.596	96.006	0.419	1.000

ns, *, ** به ترتیب تفاوت غیر معنی دار، تفاوت معنی دار در سطوح احتمال 5 و 1 درصد

ns, * and ** are non-significant and significant at 5 and 1 percent probability levels, respectively

میانگین تعداد برگ در نمونه شاهد 3/45 برگ در هر بوته بود و در پیازهای پیش تیمار شده به طور متوسط 4/49 برگ در هر بوته ثبت شد که بین دو سطح 5 و 10 میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری وجود نداشت. محلول پاشی برگ تأثیری بر تعداد برگ موسیر نداشت، ولی مقایسه میانگین ها کمترین تعداد برگ را تیمار شاهد نشان داد. تیمار برگی و ریشه ای گیاهان با انواع سیتوکینین ها در غلظت های مناسب، موجب افزایش تعداد و سطح برگ می شود (13). در آلوئه ورا محلول پاشی با بنزیل آدنین (BA)¹ تعداد برگ و وزن پاجوش های جدید را افزایش داد (18). کاربرد سیتوکینین خارجی موجب تسریع در افزایش میزان سیتوکینین درونی می گردد. افزایش سیتوکینین درونی سبب طولانی تر شدن دوره تقسیم سلولی در زمان نمو اندام ها از جمله برگ ها می شود، بنابراین تعداد و اندازه سلول ها و همچنین تعداد برگ ها تحت تأثیر سیتوکینین ها افزایش می یابند (1).

موسیر دارای قدرت تولید پیازچه کم می باشد و همین عامل مهم ترین علت محدودیت در توسعه کشت موسیر محسوب می گردد. نتایج تحقیقی با کاربرد سیتوکینین به صورت محلول پاشی بر روی برگ ها نشان داد که این گروه از تنظیم کننده ها با تأثیر بر روی تقسیم سلولی، اندازه پیاز و با تحریک رشد جوانه جانبی تعداد پیازچه ها را افزایش می دهد (14). در این بررسی پیش تیمار و محلول پاشی

فورکلورفنورون در افزایش پیازچه زایی موسیر ناکارآمد بودند و در همه بوته ها تنها یک پیاز ثبت گردید. با وجود عدم تأثیر تیمارهای فورکلورفنورون بر پیاز دهی موسیر، وزن خشک و تر پیازهای تولیدی افزایش معنی داری نسبت به نمونه شاهد نشان دادند. سیتوکینین ها با افزایش فعالیت کربوکسیلازی آنزیم روبیسکو از طریق کاهش مقاومت روزنه ای و افزایش ورود دی اکسید کربن به درون برگ، سبب افزایش کارایی فتوسنتز می گردند و در نتیجه رشد نسبی و وزن تر و خشک گیاه را افزایش می دهند (21 و 25). در این مطالعه وزن تر پیاز موسیر از 90/40 گرم به 91/77 گرم در پیش تیمار با فورکلورفنورون افزایش یافت که تفاوت معنی داری بین دو سطح 5 و 10 میلی گرم در لیتر مشاهده نگردید. در محلول پاشی نیز با افزایش 1/5 درصدی، وزن تر پیاز از 90/13 گرم در نمونه شاهد به 91/63 گرم در تیمار 100 میلی گرم در لیتر رسید. پائین ترین وزن خشک پیازها (18/49 گرم) در نمونه های شاهد مشاهده شد و بالاترین مقدار آن در پیش تیمار 10 میلی گرم در لیتر (19/69 گرم) و محلول پاشی 150 میلی گرم در لیتر (19/38 گرم) و 100 میلی گرم در لیتر (19/35 گرم) فورکلورفنورون حاصل گردید. اثر متقابل پیش تیمار و محلول پاشی در افزایش وزن خشک پیازهای موسیر معنی دار بود و در پیش تیمار 10 میلی گرم در لیتر همراه با دو سطح محلول پاشی 100 و 150 میلی گرم در لیتر بالاترین وزن خشک (19/75 گرم) ثبت گردید (شکل 1).

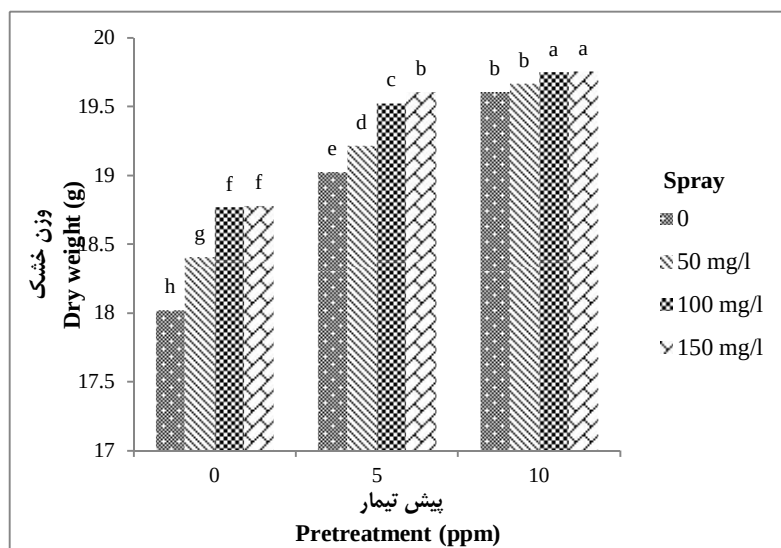
موسیر دارای قدرت تولید پیازچه کم می باشد و همین عامل مهم ترین علت محدودیت در توسعه کشت موسیر محسوب می گردد. نتایج تحقیقی با کاربرد سیتوکینین به صورت محلول پاشی بر روی برگ ها نشان داد که این گروه از تنظیم کننده ها با تأثیر بر روی تقسیم سلولی، اندازه پیاز و با تحریک رشد جوانه جانبی تعداد پیازچه ها را افزایش می دهد (14). در این بررسی پیش تیمار و محلول پاشی

جدول 2- تأثیر پیش تیمار و محلول پاشی فورکلرفنورون بر صفات مورفولوژیکی موسیر (*A. hirtifolium*)Table 2- The effect of pretreatment and spray with forchlorfenuron on morphological characters of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

	فورکلرفنورون Forchlorfenuron (mg/l)	تعداد برگ Leaf number	وزن تر پیاز Fresh weight of bulb (g)	تعداد پیاز Bulb number	وزن خشک پیاز Dry weight of bulb (g)
پیش تیمار Pretreatment	0	3.45 b	90.400 b	1.00	18.494 c
	5	4.33 a	91.047 ab	1.00	19.344 b
	10	4.49 a	91.769 a	1.00	19.692 a
محلول پاشی Spray	0	3.81 b	90.133 b	1.00	18.855 c
	50	3.89 ab	91.612 a	1.00	19.093 b
	100	4.70 a	91.627 a	1.00	19.348 a
	150	3.96 ab	90.915 ab	1.00	19.380 a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level

شکل 1- اثر متقابل پیش تیمار × محلول پاشی فورکلرفنورون بر مقدار وزن خشک پیاز موسیر (*A. hirtifolium*)

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Figure 1- The interaction effects of pretreatment × spray with forchlorfenuron on dry weight of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level

شدن اندازه ریزوم می‌شود و همچنین تجمع نشاسته در ریزوم‌ها، تحت تأثیر CPPU تسریع می‌یابد. سیتوکینین‌ها با افزایش تقسیم و انبساط سلولی در مراحل اولیه رشد، سبب تسریع نفوذ متابولیت‌ها و آب به داخل سلول‌ها می‌شوند، از این‌رو غوطه‌ورسازی و محلول‌پاشی با بنزیل آدنین باعث افزایش وزن پیازهای *Allium karataviense* گردید (26).

مقدار پروتئین پیازهای موسیر به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای فورکلرفنورون افزایش یافت (جدول 3). همچنین اثرات متقابل پیش تیمار و محلول‌پاشی در افزایش مقدار پروتئین نسبت به

افزایش وزن تر و خشک پیاز موسیر تحت تأثیر تیمارهای CPPU می‌توان به دلیل اثر سیتوکینینی این ترکیب در افزایش تقسیمات سلولی و همچنین اثر تحریکی آن در افزایش سطح برگ و فتوسنتز نسبت داد. یومیان و همکاران (34) اثر محلول پاشی با فورکلرفنورون، کلروکولین کلراید و سالیسیلیک اسید بر رشد و نمو ریزوم‌های شیرین بیان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که CPPU در مقایسه با سایر تیمارها، سبب تحریک رشد و نمو و افزایش معنی‌دار اندازه ریزوم‌های شیرین بیان گردیده است. طبق نظر این محققان CPPU با افزایش متابولیسم گیاه، سبب بزرگ‌تر

مشتقات سیتوکینینی باعث به تأخیر افتادن فرایند پیری در بخش‌های مختلف گیاهان می‌گردند که همراه با کاهش سرعت تجزیه ماکرو مولکول‌ها و افزایش سنتز پروتئین‌ها می‌باشد (30).

نمونه شاهد معنی‌دار بود، به‌طوری‌که بیشترین مقدار پروتئین (10/92 میلی‌گرم در هر گرم بافت تازه پیاز) در پیش تیمار 10 میلی‌گرم در لیتر همراه با محلول‌پاشی 100 میلی‌گرم در لیتر حاصل شد (شکل 2).

جدول 3- تأثیر پیش تیمار و محلول‌پاشی با فورکلروفنورون بر مقدار ترکیبات فیتوشیمیایی پیاز موسیر (*A. hirtifolium*)

Table 3- The effect of pretreatment and spray with forchlorfenuron on phytochemical compounds of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

	فورکلروفنورون Forchlorfenuron (mg/l)	پروتئین Protein (mg/g FW)	فنل کل Total phenol (mg GA/g FW)	آلیسین Allicin (mg/g FW)
پیش تیمار Pretreatment	0	9.766 c	0.647 b	0.862 a
	5	10.435 b	0.887 a	0.859 a
	10	10.805 a	0.772 ab	0.855 a
محلول پاشی Spray	0	10.106 c	0.526 b	0.863 a
	50	10.377 b	0.790 b	0.862 a
	100	10.426 ab	0.971 a	0.855 a
	150	10.435 a	0.787 a	0.854 a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level

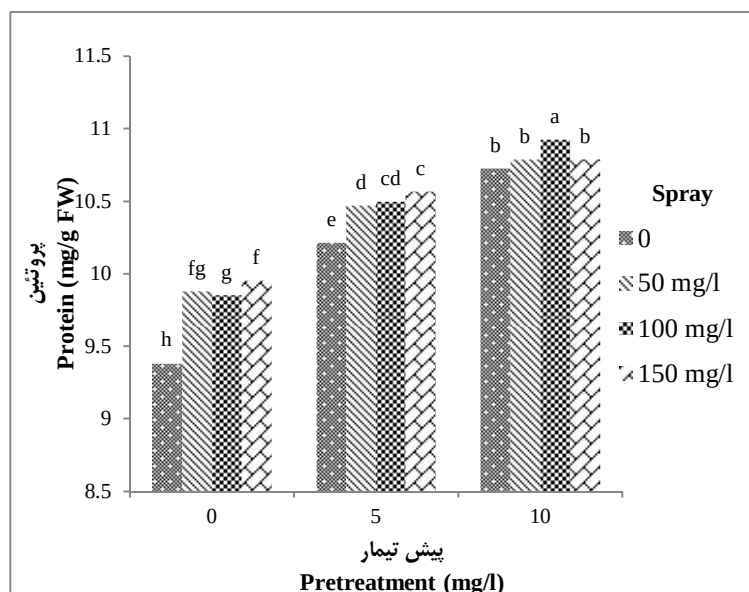
است (31و33). نتایج بررسی شیلپاشی و راویشانکار (31) نشان داد که این ترکیبات تأثیر معنی‌داری بر متابولیسم متابولیت‌های ثانویه دارند، از این‌رو برای القای مؤثر تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد قابل توصیه می‌باشد.

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوبات پراکسیداز تحت تأثیر پیش تیمار و محلول‌پاشی با فورکلروفنورون قرار گرفتند (جدول 4). یومیان و همکاران (34) افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریزوم‌های شیرین بیان تحت تأثیر تیمار CPPU را گزارش نموده‌اند. پیازهای پیش تیمار شده نسبت به نمونه شاهد فعالیت آنزیم کاتالاز کمتری نشان دادند، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (0/446 میلی‌مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در نمونه شاهد و کم‌ترین فعالیت آن (0/434 میلی‌مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در پیش تیمار 5 میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. پیازهای محلول‌پاشی شده با 50 میلی‌گرم در لیتر فورکلروفنورون بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان دادند که تفاوت معنی‌داری با دو سطوح 100 و 150 میلی‌گرم در لیتر نداشتند. بر اساس نتایج حاصل از اثرات متقابل تیمارها با یکدیگر، بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز (0/749 میلی‌مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در پیش تیمار 10 میلی‌گرم در لیتر همراه با هر سه سطح محلول‌پاشی (50، 100 و 150 میلی‌گرم در لیتر) ثبت گردید. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوبات پراکسیداز (60/241 میلی‌مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) نیز در پیش تیمار 10 میلی‌گرم در لیتر همراه با محلول‌پاشی 100 و 150 میلی‌گرم در لیتر حاصل شد (شکل 4).

پیش تیمار پیازهای موسیر تأثیری بر مقدار فنل کل نداشت، ولی مقدار ترکیبات فنلی در هر سه سطح محلول‌پاشی با فورکلروفنورون افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان داد (جدول 3). اثرات متقابل پیش تیمار و محلول‌پاشی فورکلروفنورون بر مقدار فنل کل پیازهای موسیر معنی‌دار بود و بیشترین مقدار فنل (1/585 میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم بافت تازه پیاز) در پیش تیمار 5 میلی‌گرم در لیتر همراه با محلول‌پاشی 100 میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (شکل 3). مشتقات سیتوکینینی به عنوان دریافت‌کننده پیام و القاگر تولید مقادیر زیادی متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات فنلی در گیاهان می‌باشند. در اسفناج محلول‌پاشی با BAP¹ همراه با افزایش معنی‌دار مقدار ترکیبات فنلی بود (5). افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تحت تأثیر تیمارهای مختلف سیتوکینین به علت نقش مثبت این ترکیبات در افزایش کارایی فتوسنتزی گیاهان تیمار شده می‌باشد (33).

در این مطالعه مقدار آلیسین پیازهای موسیر تحت تأثیر تیمارهای مورد بررسی تغییر معنی‌داری نشان نداد و به‌طور متوسط مقدار آن 0/859 میلی‌گرم در هر گرم بافت تازه پیاز بود (جدول 3). طبق گزارش بویه‌هان و همکاران (6) غوطه‌وری سازی بذرها و محلول‌پاشی برگ‌های پیازهای روز کوتاه با BAP، نیز تأثیری بر میزان تندی پیازهای حاصل نداشت، با این وجود اثر مثبت استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد بر تولید متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه و تأیید قرار گرفته

1- 6-Benzylaminopurine (BAP)

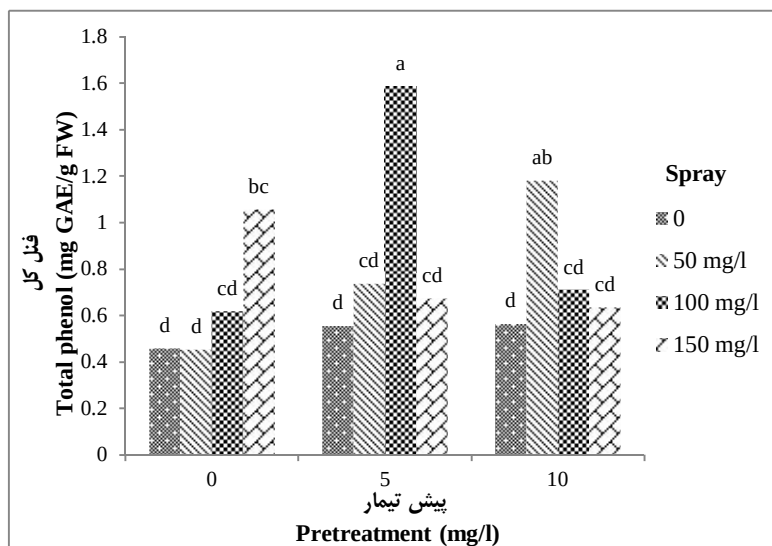


شکل 2- اثر متقابل پیش تیمار × محلول پاشی فورکلورفنورون بر مقدار پروتئین پیاز موسیر (*A. hirtifolium*)

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Figure 2- The interaction effects of pretreatment × spray with forchlorfenuron on protein content of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level



شکل 3- اثر متقابل پیش تیمار × محلول پاشی فورکلورفنورون بر مقدار فنل کل پیاز موسیر (*A. hirtifolium*)

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Figure 3- The interaction effects of pretreatment × spray with forchlorfenuron on total phenol content of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level

دارد. این ترکیبات با افزایش مکانیسم‌های آنزیمی (کاتالاز، آسکوبات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) و غیر آنزیمی (به‌ویژه ترکیبات فنلی) موجب جلوگیری از تخریب غشای سلولی توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردند (5).

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز تحت تأثیر تیمارهای مورد بررسی تغییری نشان داد و به‌طور متوسط فعالیت ویژه این آنزیم در پیازهای موسیر 66/177 واحد در میلی گرم پروتئین بود. کاربرد سیتوکینین‌ها نقش مؤثری در حفظ سیالیت و ثبات غشاهای سلولی

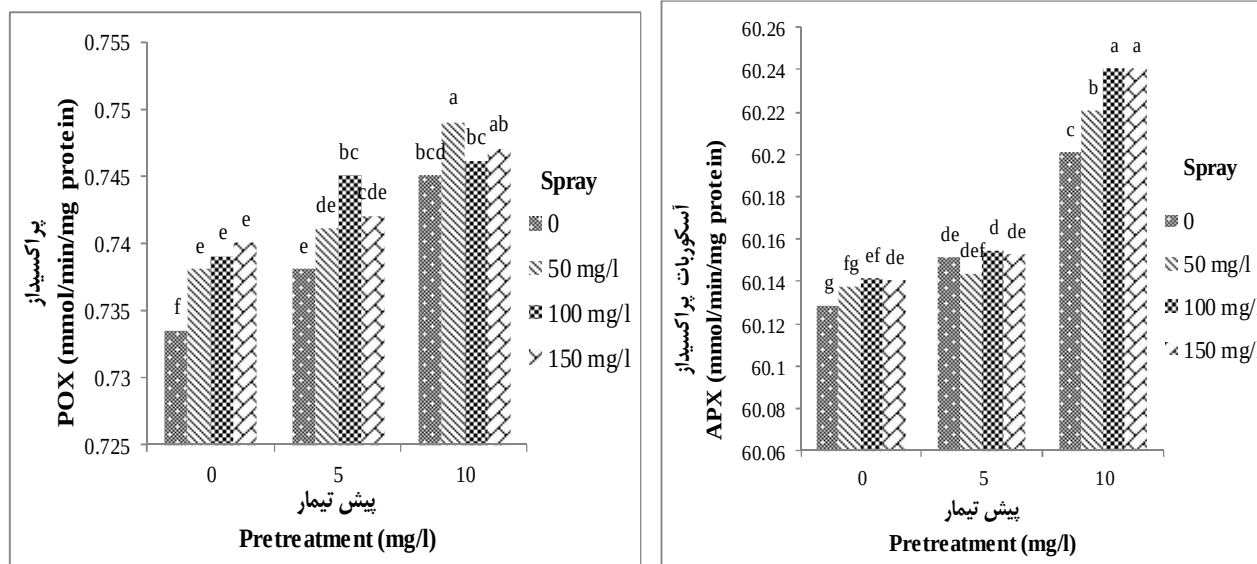
جدول 4- تأثیر پیش تیمار × محلول پاشی فورکلورفنورون بر خواص آنتی اکسیدانی پیاز موسیر (*A. hirtifolium*)

Table 4- The effect of pretreatment × spray with forchlorfenuron on antioxidant characters of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

	فورکلورفنورون Forchlorfenuron (mg/l)	فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity (%)	کاتالاز Catalase (mmol/min. mg protein)	پراکسیداز Peroxidase (mmol/min. mg protein)	آسکوبات پراکسیداز Ascorbate peroxidase (mmol/min. mg protein)	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase (unit/mg protein)
پیش تیمار	0	72.188 b	0.455 a	0.738 c	60.138 c	66.177 a
Pretreatment	5	73.334 a	0.434 c	0.742 b	60.151 b	66.177 a
	10	73.623 a	0.446 b	0.747 a	60.226 a	66.177 a
محلول پاشی	0	71.842 c	0.443 b	0.739 b	60.161 a	66.177 a
Spray	50	73.536 ab	0.448 a	0.743 a	60.168 b	66.177 a
	100	74.522 a	0.445 ab	0.743 a	60.179 a	66.177 a
	150	72.295 bc	0.445 ab	0.743 a	60.179 a	66.177 a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level



شکل 4- اثر متقابل پیش تیمار × محلول پاشی با فورکلورفنورون بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوبات پراکسیداز پیاز موسیر (*A. hirtifolium*)

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد ندارند

Figure 4- The interaction effect of pretreatment × spray with forchlorfenuron on peroxidase and ascorbate peroxidase activity of Persian shallot (*A. hirtifolium*)

Values followed by the same letter within a column indicate they are not significantly different based on Duncan's multiple range test at 5% probability level

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، پیش تیمار و محلول‌پاشی با فورکلرفنورون اگرچه قادر به تحریک جوانه‌های جانبی پیاز موسیر به رشد نبودند و تأثیری بر پیازچه‌زایی آن نداشتند ولی سبب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک پیازها گردیدند. همچنین تیمارهای مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری در افزایش ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیازهای موسیر داشتند. از این‌رو پیش تیمار 10 میلی‌گرم در لیتر پیازها همراه با محلول‌پاشی 100 میلی‌گرم در لیتر فورکلرفنورون به‌عنوان راهکاری برای بهبود عملکرد و کیفیت پیازهای موسیر از طریق افزایش وزن و خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها قابل توصیه می‌باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیازهای موسیر تحت تأثیر تیمارهای فورکلرفنورون افزایش معنی‌داری نشان داد. بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (73/623٪) در هر دو سطح پیش تیمار 5 و 10 میلی‌گرم در لیتر حاصل گردید. محلول‌پاشی اثر بیشتری در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیازها داشت و بیشترین مقدار آن (74/522٪) در تیمار 100 میلی‌گرم در لیتر ثبت شد (جدول 4). سیتوکینین‌ها از طریق افزایش سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله فنل‌ها و متابولیت‌های ثانویه و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در تعدیل تنش‌های اکسیداتیو موجب بالا رفتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌گردند (5 و 34).

منابع

- 1- Abdullakassim S., Kaewsongsang K., Anusornpornpong P., and Saradhulthat P. 2015. Effects of pre-harvested N-(2-chloro-4-pyridinyl)-N'-phenylurea (CPPU) spraying on the improvement of flower quality of *Dendrobium Sonia* 'Earsakul', Journal of Applied Horticulture, 17(2): 140-144.
- 2- Aebi H. 1983. Catalase. p. 273-277. In: Bergmeyer H. (ed.) Methods of enzymatic analysis 3. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- 3- Asadian G., Jalili H., Faramarzi J. and Babakhanlo P. 2001. Cultivation and domestication of mooseer (*Allium hirtifolium*) in Hamadan. Natural Resources Research Center of Hamadan. 15 p. (in Persian)
- 4- Asili A., Behravan J., Naghavi M.R. and Asili J. 2010. Genetic diversity of Persian shallot (*Allium hirtifolium*) ecotypes based on morphological traits, allicin content and RAPD markers, Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 1(1): 1-6.
- 5- Aslam M., Sultana B., Anwar F. and Munir H. 2016. Foliar spray of selected plant growth regulators affected the biochemical and antioxidant attributes of spinach in a field experiment, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 40: 136-145.
- 6- Boyhan G.E., Randle W.M., Purvis A.C., Lewis P.M., Torrance R.L., Curry D.E. and Linton D.O. 2001. Evaluation of growth stimulants on short-day onions, Hort Technology, 11(1): 38-42
- 7- 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: 248-54.
- 8- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensson Wiss Technology, 28: 25-30.
- 9- Chance B. and Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. p. 764-775. In: Colowick S.P. and Kaplan N.O. (eds). Methods in enzymology. Academic Press, New York.
- 10- Ebrahimi R., Zamani Z. and Kashi A. 2008. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD Markers, Scientia Horticulturae, 119: 345-351.
- 11- Ebrahimi R., Hassandokht M.R., Zamani Z., Kashi A., Roldan-Ruiz I. and Van Bockstaele E. 2014. Seed morphogenesis and effect of pretreatments on seed germination of Persian Shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.), an endangered medicinal plant, Horticulture, Environment, and Biotechnology, 55(1): 19-26.
- 12- Ebrahimi R., Zamani Z., Kashi A. and Jabbari A. 2009. Comparison of fatty acids, mineral elements of 17 Iranian shallot landraces (*Allium hirtifolium* Boiss.), Iranian Journal of Food Science and Technology, 5(1): 61-68. (in Persian with English abstract)
- 13- Fathi G. and Esmaeilpor B. 2000. Plant growth regulators: Principal and application. 2th edition, Jahad Daneshgahi Press of Mashhad. 288 p. (in Persian)
- 14- Franssen J.M. and Vosken P.G.M. 1997. Competition between sprout and daughter bulbs for carbohydrates in tulip as affected by mother bulb size and cytokines, Acta Horticulture, 430: 63-71.
- 15- Ghahremani-Majd H. and Dashti F. 2013. Genetic diversity of Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) populations based on morphological traits and RAPD markers, Plant Systematics and Evolution, DOI 10.1007/s00606-013-0940-5.
- 16- Ghodrati Azadi H., Mahmood Ghaffari S., Riazi G.H., Ahmadian S. and Vahedi F. 2008. Antiproliferative activity of chloroformic extract of Persian Shallot, *Allium hirtifolium*, on tumor cell lines, Cytotechnology, 56: 179-185.
- 17- Giannopolitis C. and Ries S. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants, Plant Physiology, 59:

- 309-314.
- 18- Hazrati S., Tahmasebi Sarvestani Z., Beyraghdar A., Mojab F. and Hosseini S.J. 2011. Effect of benzyladenine foliar sprays on offsets production and root growth of *Aloe Barbadensis* Miller, Nature and Science, 9(3): 100-104.
- 19- Humphery T. 2005. Evaluation of the new active forchlorfenuron in the product Sitofex 10 EC plant growth regulator. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. pp. 1-30.
- 20- Khaligi A., Hojati Y., Babalar M. and Naderi R. 2006. Investigation of nutrient solution, cytokinin and soil structure effects on quantity and quality characters as well as bulbs number of Darwin tulip hybrid Eplederon variety, Pazhuhesh va Sazandegi in Horticulture and Agronomy, 73: 58-64. (in Persian)
- 21- Kim J.G., Takami Y., Mizugami T., Beppu K., Fukuda T. and Kataoka I. 2006. CPPU application on size and quality of hardy kiwifruit, Scientia Horticulturae, 110: 219-222.
- 22- Miron T., Shin I., Feigenblat G., Weiner L., Mirelman D., Wilchek M. and Rabinkov A. 2002. A spectrophotometric assay for alliin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: Reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates, Analytical Biochemistry, 307: 76-83.
- 23- Nakano Y. and Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, Plant Cell Physiology, 22: 867-280.
- 24- Omidbaigi R. 2009. Production and processing of medicinal plant. 5th Edition. Astan Ghods Razavi Press, 397 p. (In Persian)
- 25- Patil H.G., Ravindran C., Jayachandran K.S. and Jaganath S. 2006. Influence of CPPU, TDZ and GA₃ on the post-harvest quality of grape (*Vitis vinifera* L.) cultivares 'Anab-e-shahi' and 'Dilkush', Acta Horticulturae, 727: 489-494.
- 26- Pogroszewska E., Laskowska H. and Durlak W. 2007. The effect of gibberellic acid and benzyladenine on the yield of (*Allium karataviense* Regel.) 'ivory queen', Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 6(1): 15-19.
- 27- Rabinkov A., Zhu X.Z., Grafi G., Galili G. and Mirelman D. 1994. Alliin lyase (Allinase) from garlic (*Allium sativum*), Applied Biochemistry and Biotechnology, 48: 149-71.
- 28- Ricci A., Incerti M., Rolli E., Vicini P., Morini G., Comini M. and Branca A. 2006. Diheteroarylurea derivatives as adventitious rooting adjuvants in mung bean shoots and M26 apple rootstock, Plant Growth Regulation, 50(2): 201-209.
- 29- Saniewski M. and Kawa L. 1992. Hormonal control of growth and development of tulips, Acta Horticulturae, 325: 43-540.
- 30- Saruhan V., Kusvuran A. and Babat S. 2011. The effect of different humic acid fertilization on yield and yield components performances of common millet (*Panicum miliaceum* L.), Scientific Research and Essays, 6: 663-669.
- 31- Shilpashree H.P. and Ravishankar R. 2009. In vitro plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorensense*, International Journal of Integrative Biology, 8: 43-49.
- 32- Slinkard K. and Singleton V.L. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
- 33- Stopari G. and Maksimovi I. 2008. The effect of cytokinins on the concentration of hydroxyl radicals and the intensity of lipid peroxidation in nitrogen deficient wheat, Cereal Research Communications, 36: 601-609.
- 34- Yumian X., Linfang S., Le C. and Yiping X. 2013. Effect of three plant growth regulators on the bulblets development of lycoris radiate, Journal of Nuclear Agricultural Science, 27(9): 1409-1415.



The Effect of Forchlorfenuron on Bulblet Formation, Antioxidant Characteristics and Phytochemicals Compounds of Persian Shallot (*Allium hirtifolium*)

N. Farhadi¹- S. Alizadeh Salteh^{2*}

Received: 27-07-2016

Accepted: 21-02-2017

Introduction: *Allium hirtifolium* commonly known as Persian shallot is an important wild medicinal plant from *Alliaceae* family. Persian shallot commonly known as mooseer in Iran is a perennial diploid plant that is native to Iran and grows as a wild plant throughout in the Zagross Mountains range, western and southwestern Iran. It is a bulbous herb and usually consists of a single main bulb or rarely two bulbs. Each bulb has a weight of about 8-15 times of a garlic clove. The bulbs of mooseer has been widely used as a traditional herb and spice plant, added to a variety of foods such as salads, pickles, yogurt and different sauces. Conventionally, Persian shallot propagates through bulbs and seeds but these two methods are not commercially efficient due to low growth rate of bulbs and deep dormancy, low viability and germination rate of seeds. In addition, the natural habitat of this plant is under increasing pressure as a result of excessive incorrect harvest that caused to damage the plant density in Iran rangelands. So, improving the efficiency of *A. hirtifolium* propagation is necessary. A number of positive effects on the growth and productivity of some plants through cytokinin application have been registered by earlier research. The current study aimed to evaluate the effects of pretreatment and foliar application of forchlorfenuron as a safe cytokinin on improving the bulb production, phytochemical compounds and antioxidant attributes of Persian shallot.

Materials and Methods: This experiment was done at research green house of Tabriz University in 2015-2016. For pretreated of Persian shallot bulbs, they were soaked in 0, 50 and 10 mg l⁻¹ forchlorfenuron solutions for 24 h. Then they were cultured in pots contained perlite and vermicompost with 3:1 ratio. Foliar application was applied 2, 4 and 6 weeks after culture with 0, 50, 100 and 150 mg l⁻¹ concentrations of forchlorfenuron. At the end of growth season the number of leaves, number of bulblets, fresh and dry weight of bulblet were recorded. The phytochemical compound (protein, phenol and allicin), antioxidant enzymes (catalase, peroxidase, ascorbate peroxidases and superoxide dismutase) and antioxidant activity of bulbs were assayed with spectrophotometry methods.

Results and Discussion: Foliar applications of plant growth regulators such as cytokinins in agriculture crops are reported to be useful in controlling multiple physiological processes, including flower initiation, shoot elongation, bulb production, fruit set and as well as affected the quality characters of products. In this study despite the bulblets number that did not influence by treatments, pretreatment and foliar application of forchlorfenuron significantly increased the leaves number, fresh and dry weight of bulbs in comparison with control plants. The highest leaves number (4.49 per plant) was obtained from pretreatments. The highest fresh weight (91.77 g) was recorded at 5 and 10 mg l⁻¹ pretreatment and 100 mg l⁻¹ (91.63 g) foliar application. The interaction effect of treatments on dry weight was significant and the highest dry weight (19.75 g) was recorded at 10 mg l⁻¹ pretreatment with 100 and 150 mg l⁻¹ foliar application. Allicin content did not show significant variation between treatments and in average was 0.859 mg g⁻¹ FW. Total phenol content significantly influenced by treatments and the highest phenol content (1.585 mg GAE g⁻¹ FW) was recorded at 5 mg l⁻¹ pretreatment with 100 mg l⁻¹ foliar application. The antioxidant enzymes included catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase that showed significant increasing under forchlorfenuron treatments. Due to significant effects of forchlorfenuron on antioxidant compounds and enzymes of Persian shallot bulbs, the assay of antioxidant activity also showed a significant increasing in treated bulbs. The maximum percent of antioxidant activity (74.522) was obtained from 100 mg l⁻¹ foliar application. Exogenous application of cytokinins plays an effective role by protecting the fluidity and integrity of plant cell membranes. They properly mediate enzymatic (SOD, APX, and CAT) and non-enzymatic machinery with the result of preventing cell membrane damage by oxidative stress.

Conclusions: Considerable improvement in biochemical and antioxidant attributes of Persian shallot was recorded with pretreatment and foliar application of forchlorfenuron. The present data support the potential uses of the forchlorfenuron for improving the production of weighty bulbs with the high antioxidants attributes in

1 and 2- Phd Students and Assistant Professor of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University
(*- Corresponding author: Email: s.alizadeh@tabrizu.ac.ir)

Allium hirtifolium. Pretreated and foliar application at 5 mg l⁻¹ and 100 mg l⁻¹ concentrations of forchlorfenuron, respectively showed the best results and is recommendable for *A. hirtifolim* production.

Keywords: Allicin, Antioxidant enzymes, Bulblet, Pretreatment, Cytokinin, Foliar application



اثر محلول پاشی برخی عناصر ریز مغذی در قبل و بعد از گلدهی بر ویژگی های کمی و کیفی میوه انگور رقم "خوشناو"

زهرا داوودخواه¹ - بیژن کاوسی^{2*}

تاریخ دریافت: 1395/06/13

تاریخ پذیرش: 1396/02/13

چکیده

یکی از دلایل کاهش عملکرد در تاکستان ها و نیز کاهش کیفیت میوه های انگور، عدم مصرف متعادل کود می باشد. هدف از این پژوهش، تعیین بهترین غلظت و زمان کاربرد کود فروزنیک (حاوی آهن، روی و منگنز) بر برخی ویژگی های کمی و کیفی انگور تازه خوری رقم خوشناو بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد که فاکتور اول سطوح مختلف کود (0، 500، 1000، 1500، 2000 میلی گرم در لیتر) و فاکتور دوم زمان محلول پاشی (قبل از گلدهی، بعد از گلدهی و قبل و بعد از گلدهی) بود. نتایج نشان داد که اثر کاربرد کود فروزنیک بر صفات متوسط وزن خوشه، متوسط وزن میوه در یک خوشه، نسبت TSS/TA، pH و ویتامین ث، معنی دار بود ($p \leq 0.01$). همچنین اثر زمان محلول پاشی بر تمام صفات به استثناء واکنش آب میوه معنی داری بود ($p \leq 0.01$). بیشترین وزن خوشه، متوسط وزن میوه در یک خوشه، TSS/TA، pH و ویتامین ث در تیمار کود (حاوی آهن، روی و منگنز) با غلظت 1000 میلی گرم در لیتر و در تیمار زمان گلدهی هر دو (قبل و بعد از گلدهی) به دست آمد.

واژه های کلیدی: تاکستان، زمان گلدهی، عملکرد، وزن خوشه، ویتامین ث

مقدمه

انگور دیم 402/465 هکتار که 2/465 هکتار بارور و 400 هکتار غیر بارور می باشد و میانگین عملکرد 2/966/73 کیلوگرم در هکتار و میزان تولید 7/313 تن می باشد که سومین محصول باغی در این استان محسوب می گردد (1).

یکی از دلایل پائین بودن عملکرد و نیز کیفیت میوه ها، عدم مصرف متعادل کود یا به عبارت دیگر تغذیه نامطلوب بوته ها است (4). یکی از عناصر غذایی ضروری کم مصرف که نقش مهمی در افزایش تولید و کیفیت محصول بازی می کند، عنصر آهن است. بخش بزرگی از خاک های زراعی کشور، به ویژه نواحی جنوبی مانند کهگیلویه و بویر احمد، حاوی مقادیر زیادی کربنات کلسیم هستند که سبب افزایش واکنش خاک و ایجاد اختلال در جذب عناصر آهن، روی، فسفر، منگنز و غیره می شود (11). بنابراین نمی توان از روش های محلول پاشی، تزریق در تنه درخت و یا به صورت کلات در خاک استفاده نمود. بدیهی است که کاهش جذب آهن سبب کاهش عملکرد و کیفیت محصولات باغی خواهد شد (17). نتایج یک پژوهش وسیع که به منظور شناخت ناهنجاری های تغذیه ای در تاکستان های استان کهگیلویه و بویر احمد به عمل آمد، نشان داد که چهل و یک درصد از تاکستان ها، دچار کمبود روی هستند و زرد برگی

انگور از تیره ویتاسه³ با نام علمی ویتیس ونیفر⁴ می باشد. این تیره دارای بیش از 16 جنس و 600 گونه و ده هزار رقم مختلف است و جنس ویتیس تنها جنس این خانواده است که میوه خوراکی دارد. جنس ویتیس خود به دو زیرجنس Euvitis و تعداد کروموزم های $2n=38$ و Muscadine و تعداد کروموزم های $2n=40$ تقسیم می شود (13). در استان کهگیلویه و بویر احمد سطح زیر کشت انگور آبی 119/209 هکتار که 118 هکتار غیر بارور و 1/209 هکتار بارور می باشد و میانگین عملکرد آن 21/974/36 کیلوگرم در هکتار و میزان تولید معادل 26/567 تن می باشد. همچنین سطح زیر کشت

1- دانشجوی اسبق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
2- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات کشاورزی و آموزش و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: Kavooosi696@yahoo.com)

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.57543

3-Vitaceae

4-Vitis vinifera L.

ناشی از کمبود روی یکی از شایعترین کمبودهای تغذیه‌ای در تاکستان‌های استان کهگیلویه و بویراحمد می‌باشد. از طرفی بر اساس همین تحقیق، خاک باغ‌های انگور استان به شدت آهکی بوده به گونه‌ای که میزان آهک در مواردی به 60 درصد نیز بالغ می‌گردد و pH آنها نیز بالا و در بعضی باغ‌ها به 7/8 می‌رسد (11). منگنز به میزان بسیار کمی مورد نیاز گیاه است و در صورت زیاد شدن میزان آن در خاک، اثر مسموم کننده روی گیاه خواهد داشت. وجود منگنز برای بسیاری از فرایندهای گیاهی مانند فتوسنتز، تنفس و ساخت کلروفیل ضروریست. نشانه‌های کمبود آن در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشد. سوختگی کنار برگ‌ها و یا لکه سوختگی‌های میانه برگ‌ها، همچنین کاهش رشد و گل دهی گیاه از نشانه‌های کمبود آن است و چون مانند آهن درون گیاه غیر قابل انتقال است، ابتدا برگ‌های جوان نشانه‌های کمبود را نشان می‌دهند (15).

منگنز در pHهای قلیایی، در خاک تثبیت شده و با پایین آوردن pH خاک، بیشتر قابل استفاده می‌گردد. در خاک‌های خیلی اسیدی ممکن است به علت افزایش بیش از حد جذب آن، در گیاه مسمومیت ایجاد شود. برای رفع کمبود منگنز از سولفات منگنز استفاده می‌شود که در خاک‌های ایران‌بازده آن بسیار ناچیز است (15). بی شک تثبیت عناصر در چنین شرایطی بالا و جذب روی توسط گیاه به دشواری از خاک انجام می‌گیرد و مصرف کود در چنین خاک‌هایی از بازدهی بسیار کمی برخوردار بوده و برآورنده نیاز گیاه نیست. لذا مطالعه راه‌های دیگر تغذیه برای رفع کمبود عناصر غذایی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه اثر محلول پاشی عناصر روی، آهن و منگنز بر عملکرد و برخی خصوصیات میوه انگور نشان دادند که عملکرد محصول و خصوصیات میوه بهبود یافت (3). اثر محلول پاشی عناصر روی، آهن و منگنز در زمان‌های مختلف بر خصوصیات کمی و کیفی انگور قرمز مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که ضمن افزایش عملکرد محصول، وزن، اندازه و دیگر خصوصیات دانه‌ها افزایش یافت. همچنین درصد مواد جامد محلول حبه‌ها افزایش و اسید کاهش پیدا کرد (5). نتایج مطالعه‌ای دیگر، نشان داد که محلول پاشی عناصر بور، منگنز، روی و مس در بهار در انگور باعث افزایش عملکرد انگور و میزان قند حبه‌ها و کاهش اسیدکل شد (21). پژوهشگرانی در ایتالیا، با محلول پاشی بور و روی بر روی ارقام مختلف انگور مشاهده کردند که در بعضی از ارقام مصرف روی به تنهایی و در بعضی دیگر از ارقام مصرف توام روی و بور سبب افزایش عملکرد محصول گردید. ضمن اینکه شاخص‌هایی چون TSS، اسید و pH بهبود یافت (23). در پژوهشی اثر تغذیه برگی عناصر غذایی بر تشکیل میوه و خصوصیات کمی و کیفی انگور کشمش بررسی شد و نتایج نشان داد که اثر محلول پاشی عناصر نیتروژن، بور و روی بر درصد تشکیل میوه در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود. بیشترین درصد تشکیل میوه در تیمارهای حاوی عنصر روی و کمترین درصد در شاهد و تیمارهایی

وجود داشت که در آنها عناصر بور یا اوره تنها و یا در ترکیب با هم به کار رفته بودند. نتایج تجزیه برگی هم نشان داد که در تیمارهای حاوی روی، محلول پاشی باعث افزایش غلظت عنصر روی در برگ‌ها تا 68/1 پی‌پی‌ام شد اما محلول پاشی نیتروژن و بور تاثیر افزایشی چندانی مشخصی بر مقدار آن‌ها در برگ‌ها نداشت. در مجموع، محلول پاشی بوته‌های انگور رقم کشمش سفید با عناصر نیتروژن، بور و روی به ترتیب با غلظت‌های 5، 1/5 و 1/5 در هزار، تاثیر مثبتی بر درصد تشکیل میوه داشت و نقش عنصر روی بیشتر از بقیه عناصر بود (10). هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر کاربرد محلول پاشی کود حاوی آهن، روی و منگنز در قبل و بعد از گلدهی بر ویژگی‌های کمی و کیفی میوه انگور تازه خوری رقم خوشناو بود.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی اثر محلول پاشی عناصر ریز مغذی آهن، روی و منگنز (از منبع فروزینک، حاوی عناصر آهن 7/1 درصد، روی 8/5 درصد و منگنز 3/2 درصد) بر ویژگی‌های کمی و کیفی انگور (رقم خوشناو)، آزمایشی در منطقه‌ی چیتاب یاسوج (استان کهگیلویه و بویر احمد) در یک تاکستان شخصی با ارتفاع 1735 متر از سطح دریا، طول جغرافیایی 51 درجه و 19 دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی 30 درجه و 47 دقیقه شمالی در سال 1392 انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد، که فاکتور اول سطوح مختلف کود فروزینک (0، 500، 1000، 1500، 2000 میلی گرم در لیتر) و فاکتور دوم زمان محلول پاشی (قبل از گلدهی، بعد از گلدهی و قبل و بعد از گلدهی) بود که در هر تکرار (12 بوته) و در مجموع تعداد 48 بوته در نظر گرفته شد. در این پژوهش به منظور کاهش اثر جانبی (خطا)، بوته‌های هم‌سن (13 ساله) غیر پیوندی با رشد تقریباً یکسان انتخاب و هرس آنها به صورت یکسان انجام شد. سیستم تربیت بوته‌ها به صورت پاچراغی و به فاصله کشت 2/5×3 بود. برای افزایش راندمان جذب عناصر غذایی، محلول پاشی هنگام غروب انجام شد و از محلول مویان کیمیا (گروه تولیدی پردیس) به محلول‌های غذایی اضافه شد. برای مشخص نمودن اثر تیمارهای اعمال شده بر وضعیت کمی و کیفی میوه‌ها، صفاتی همچون متوسط وزن خوشه، متوسط وزن میوه در یک خوشه، نسبت pH، TSS/TA و ویتامین ث آب میوه ارزیابی شد. اندازه‌گیری متوسط وزن خوشه بر اساس اندازه گیری میانگین وزن کل 5 خوشه با ترازوی دیجیتالی محاسبه گردید. متوسط وزن میوه در یک خوشه از طریق تقسیم کردن وزن کل حبه‌های جدا شده از 5 خوشه بر تعداد خوشه‌ها محاسبه گردید. برای تعیین نسبت TSS/TA در ابتدا درصد کل مواد جامد محلول با دستگاه رفرکتومتر دستی ATAGO مدل E1 ساخت ژاپن قرائت گردید و سپس درصد اسید

1). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر متوسط وزن خوشه انگور بین زمان‌های مختلف گلدهی اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین وزن خوشه (211/4 گرم) مربوط به زمان هر دو (قبل و بعد از گلدهی) و کمترین وزن خوشه (203/733 گرم) مربوط به زمان قبل از گلدهی بود (شکل 2).

متوسط وزن میوه در یک خوشه

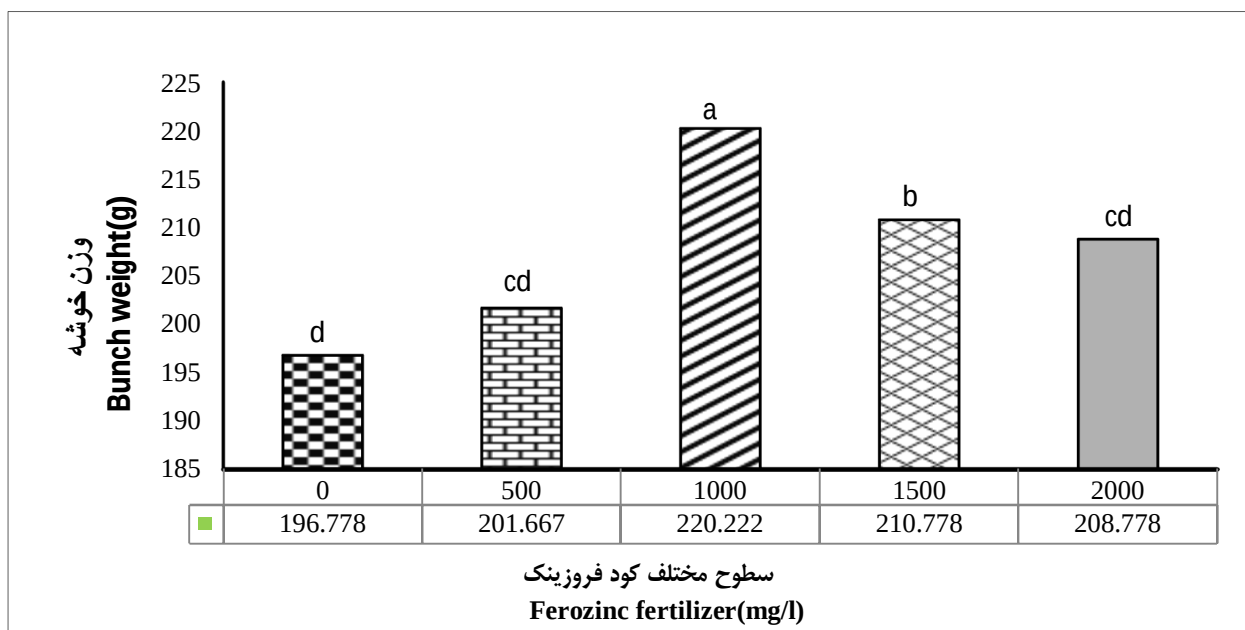
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی بر متوسط وزن میوه در خوشه در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌داری دارند (جدول 1). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف کود فروزینک بر متوسط وزن میوه در یک خوشه انگور اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین وزن میوه در یک خوشه (215/887 گرم) مربوط به تیمار 1000 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و کمترین وزن میوه در یک خوشه (193/684 گرم) مربوط به تیمار شاهد (آب مقطر) بود (شکل 3). همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر متوسط وزن میوه در یک خوشه انگور بین زمان‌های مختلف گلدهی اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین وزن میوه در یک خوشه (207/407 گرم) مربوط به زمان هر دو (قبل و بعد از گلدهی) و کمترین وزن میوه در یک خوشه (200/124 گرم) مربوط به زمان قبل از گلدهی بود (شکل 4).

کل با روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد. واکنش آب میوه به وسیله یک pH متر عقربه‌ای مدل هفت ساخت انگلیس مشخص گردید. برای اندازه‌گیری میزان ویتامین ث از روش جاکوبس (بدین صورت که ابتدا 10 میلی لیتر آب میوه را با 20 میلی لیتر آب مقطر رقیق کرده و 2 میلی لیتر نشاسته یک درصد به عنوان معرف به آن اضافه شد. سپس این مخلوط با رنگ بر در یدور پتاسیم تیتره و مقدار رنگ مصرفی مشخص گردید) استفاده گردید (12). پس از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از نرم افزار آماری MSTAT-C تجزیه آماری شده، میانگین‌ها توسط آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند و رسم شکل‌ها با نرم افزار EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

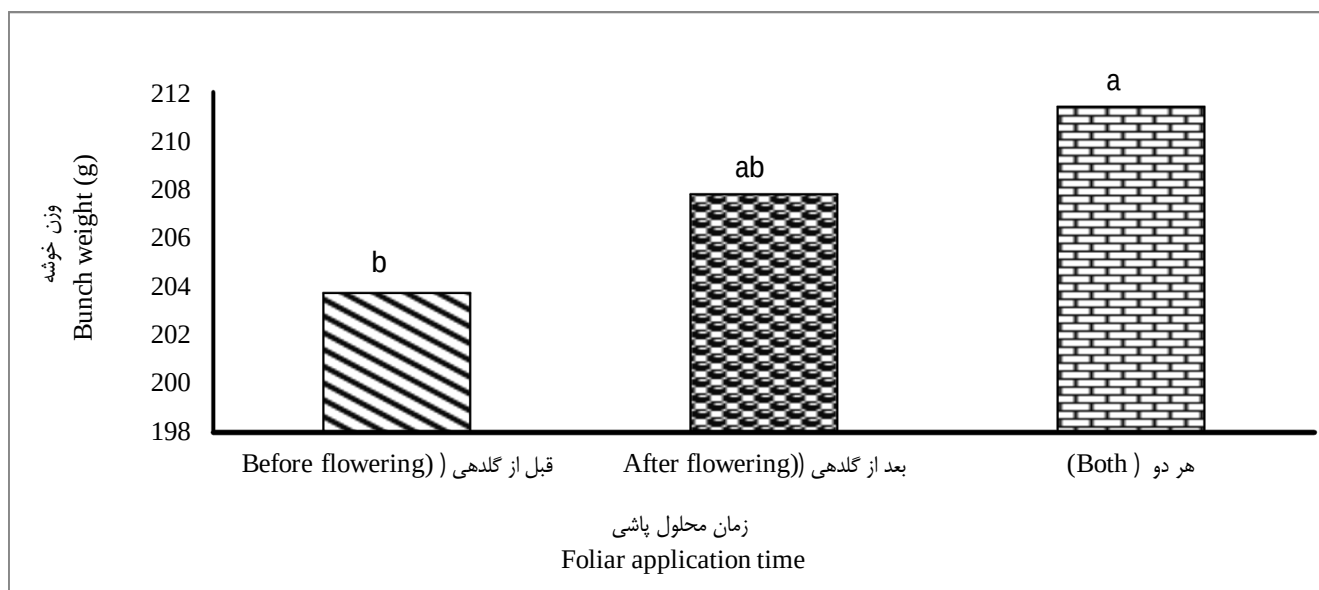
متوسط وزن خوشه

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی بر متوسط وزن خوشه در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌داری دارند (جدول 1). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف کود فروزینک بر متوسط وزن خوشه انگور اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین وزن خوشه (220/222 گرم) مربوط به تیمار 1000 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و کمترین وزن خوشه (196/778 گرم) مربوط به تیمار شاهد (آب مقطر) بود که تاثیر تیمار شاهد با تیمار 500 میلی گرم در لیتر تفاوت نداشت (شکل



شکل 1- تاثیر سطوح مختلف کود فروزینک بر وزن خوشه انگور رقم خوشناو

Figure 1 - Effect of different levels of ferozinc fertilizer on the bunches weight of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test.



شکل 2- تاثیر زمان‌های مختلف محلول پاشی بر وزن خوشه انگور رقم خوشناو

Figure 2 - Effect of different flowering times on the bunch weight of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) with Duncan test

جدول 1- تجزیه واریانس مربوط به تاثیر کود فروزینک و زمان‌های مختلف محلول پاشی بر خصوصیات کمی و کیفی انگور رقم خوشناو
Table 1- ANOVA analysis of the effect of ferozinc fertilizer and different foliar times on quantitative and qualitative characteristics of table grape cv. khoshnaw

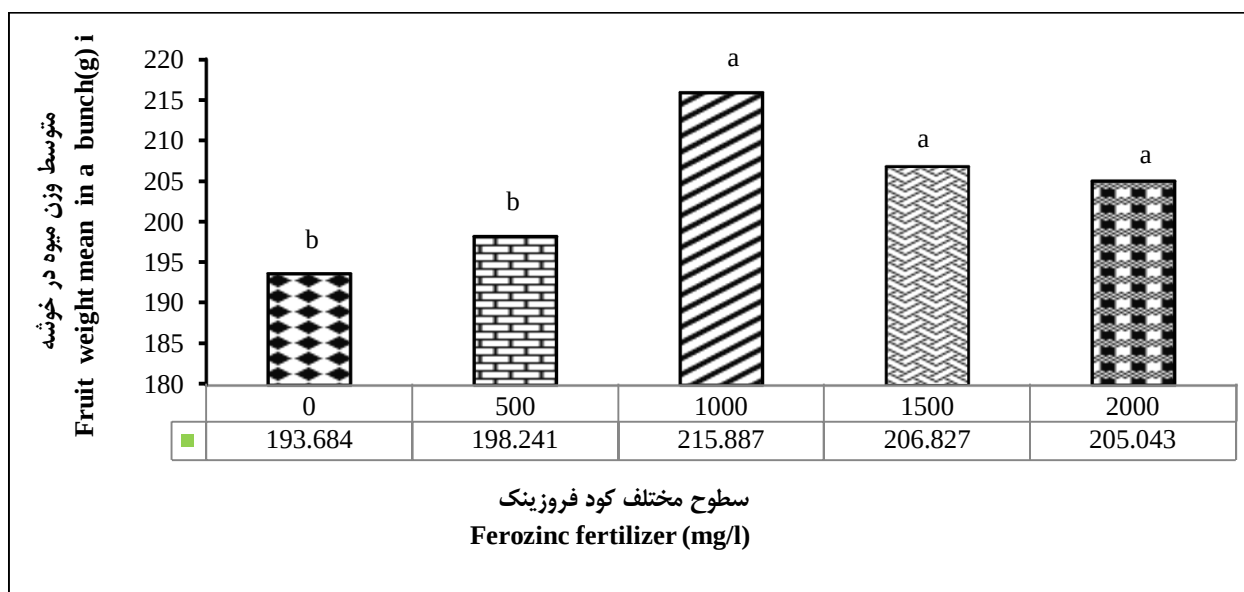
میانگین مربعات Means of Squares						
منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	وزن خوشه Bunch weight	وزن میوه در یک خوشه Fruit weight in a bunch	TSS/TA	Vitamin C ویتامین ث	pH
تکرار Repetition	3	45235.56**	45101.299**	4.851**	0.015 ^{ns}	0.310**
کود فروزینک Ferozinc (A)	4	727.022**	652.335**	21.498**	0.356**	0.054**
زمان محلول پاشی Foliar time (B)	2	220.689**	200.207**	18.213**	0.054**	0.003 ^{ns}
A×B	8	^{ns} 55.439	48.531 ^{ns}	1.666 ^{ns}	0.044**	0.007**
خطا Error	42	30.794	30.760	0.918	0.010	0.002
ضریب تغییرات (درصد CV)		2.67	2.72	3.22	2.40	1.37

* و **: به ترتیب معنادار در سطوح احتمال 5 و 1 درصد و ^{ns}: غیر معنادار

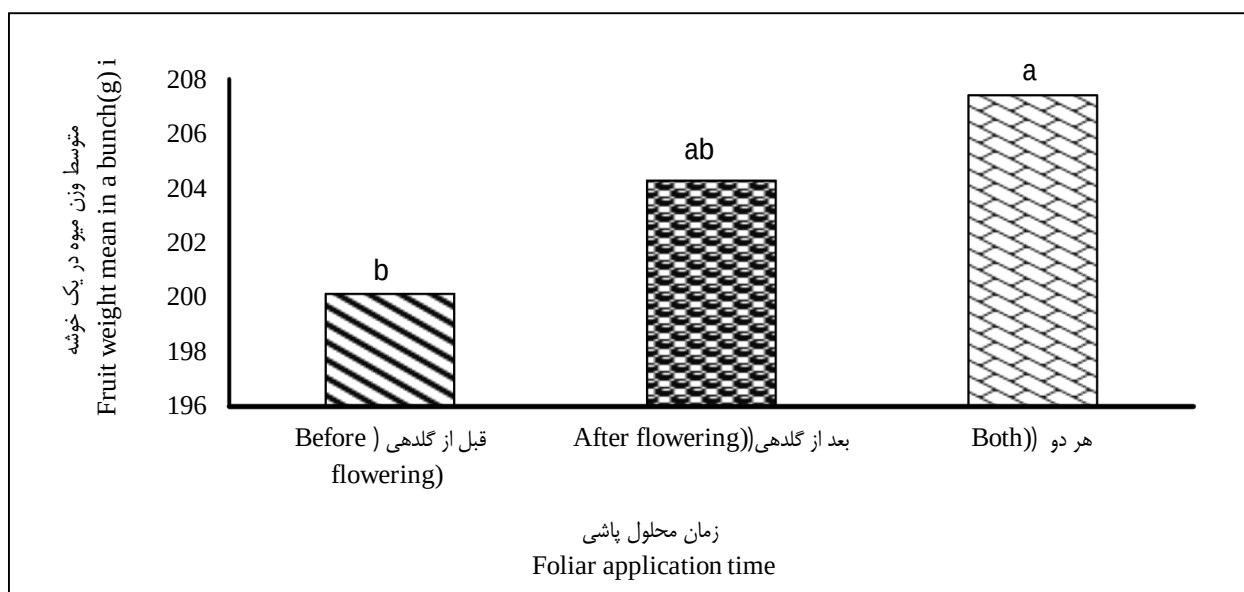
* and **: respectively the significantly different (P<0.05 and 0.01) and ^{ns}: not significantly different

تمام گل موجب افزایش تعداد حبه‌ها شده است (8). آگیو (2)، نشان داد که محلول پاشی عناصر غذایی موجب افزایش میزان محصول و میزان قند میوه انگور می‌شود. مرشدی (19)، گزارش کرد که با کاربرد سولفات روی با غلظت 5 در هزار، میزان تشکیل میوه در انگور افزایش یافته است.

یامداگنی و همکاران (25) در یک آزمایش دو ساله روی انگور رقم بیدانه سلطانی نشان دادند که محلول پاشی سولفات روی با غلظت 2 در هزار در یک هفته قبل از باز شدن گل‌ها و در زمان تمام گل موجب افزایش تشکیل میوه، تعداد خوشه‌ها، وزن خوشه، میزان محصول و مواد جامد محلول شد. پژوهشگرانی دیگر اعلام کردند، که محلول پاشی انگور با سولفات روی (5 در هزار) در یک هفته قبل از



شکل 3- تاثیر سطوح مختلف کود فروزینک بر وزن میوه در یک خوشه انگور رقم خوشناو
 Figure 3 - Effect of different ferozinc levels on fruit weight in a bunch of table grape cv. Khoshnaw
 Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test



شکل 4- تاثیر زمان های مختلف محلول پاشی بر وزن میوه در یک خوشه انگور رقم خوشناو
 Figure 4 - Effect of different foliar times on the fruit weight in a bunch of table grape cv. Khoshnaw
 Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test

تعداد دانه در سنبله و وزن هزار دانه شد که از بین این اجزاء تأثیر مصرف روی بر تعداد سنبله در متر مربع شدیدتر بود (21). بعضی عناصر غذایی کم مصرف همانند روی و آهن برای رشد گیاه ضروری هستند و در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، تولید هورمون‌های رشد و تشکیل کلروفیل گیاهی دخالت دارند و

محققان گزارش کردند که مقادیر مختلف کود روی و آهن بر تعداد دانه در خوشه گیاه برنج در سطح یک درصد تأثیر معنی داری داشته و موجب افزایش معنی دار آن شده است (14). محققان تحت آزمایشی اظهار داشتند که مصرف روی موجب افزایش معنی داری در عملکرد دانه گندم و اجزاء عملکرد از جمله تعداد سنبله در متر مربع،

مربوط به تیمار شاهد (آب مقطر) بود (شکل 5). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر نسبت TSS/TA انگور بین زمان‌های مختلف گلدهی اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین نسبت TSS/TA (31/042) مربوط به زمان هر دو (قبل و بعد از گلدهی) و کمترین نسبت TSS/TA (29/107) مربوط به زمان قبل از گلدهی بود (شکل 6)

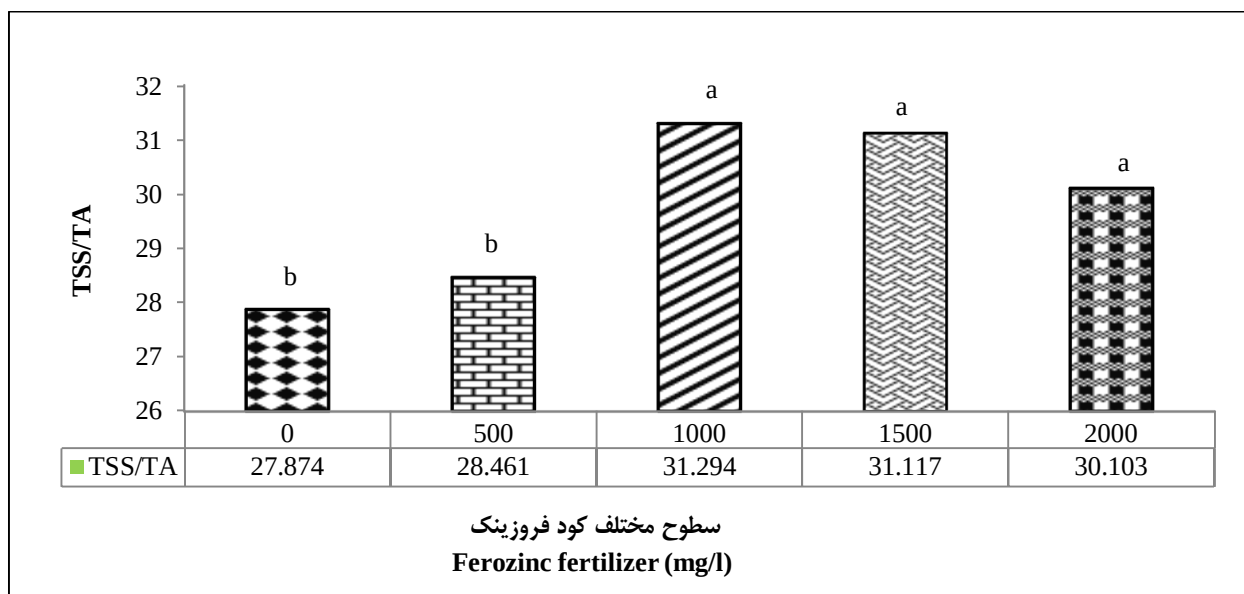
روی از عناصر ریزمغذی است که جهت تشکیل و تولید میوه مناسب با اندازه مطلوب آن مورد نیاز است. این عنصر در قسمتی از آنزیم کربنیک آنهیدراز در همه بافت‌های فتوسنتزی حضور دارد که برای بیوسنتز کلروفیل مورد نیاز است. روی همچنین در سنتز تریپتوفان که یک پیش ماده سنتز اکسین است نقش دارد (16). ویلیا (24) بیان نمود، که در درختان هلو کمبود روی منجر به تولید میوه‌های کوچک، بد شکل و باکیفیت بسیار پایین می‌شود. کاربرد روی در انبه سبب افزایش وزن میوه و وزن هسته‌ها شده است. محلول پاشی درختان پرتقال دارای کمبود روی در فروردین و اردیبهشت موجب افزایش اندازه میوه، مواد جامد محلول و آب میوه شده است (6). در پژوهش دیگری که از غلظت‌های مختلف سولفات روی و سولفات آهن بر روی انگور رقم بیوتی استفاده شد، بیشترین مواد جامد محلول در تیمار 2 در هزار آهن حاصل شد (8). دیکسیت و همکاران (9)، مشاهده کردند که محلول پاشی درختان پرتقال در فروردین و اردیبهشت موجب افزایش اندازه میوه و مواد جامد محلول در آب میوه می‌شود.

کمبود آنها می‌تواند موجب عدم توازن عناصر غذایی در گیاه و نهایتاً کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود (7).

در کل می‌توان نتیجه گرفت که محلول پاشی بوته‌های انگور رقم خوشناو با کود حاوی آهن، روی و منگنز تاثیر مثبتی بر متوسط وزن خوشه و متوسط وزن میوه در خوشه دارد، که در این بین احتمالاً نقش عنصر روی بیشتر از بقیه عناصر بوده است. در این راستا دولتی بانه و طاهری (10)، بیشترین درصد تشکیل میوه انگور رقم کشمش سفید را در تیمار محلول پاشی عنصر روی و کمترین درصد را در تیمار شاهد مشاهده کردند. محلول پاشی روی به تنهایی و یا در ترکیب با (اوره 5 در هزار) باعث افزایش وزن خوشه انگور رقم کشمش سفید شد که نقش عنصر روی را بیشتر از بقیه عناصر بیان نموده‌اند. در پژوهش دیگری که از غلظت‌های مختلف سولفات روی و سولفات آهن بر روی انگور رقم بیوتی استفاده شد، بزرگترین حبه‌ها در تیمار 6 در هزار روی به دست آمد (8).

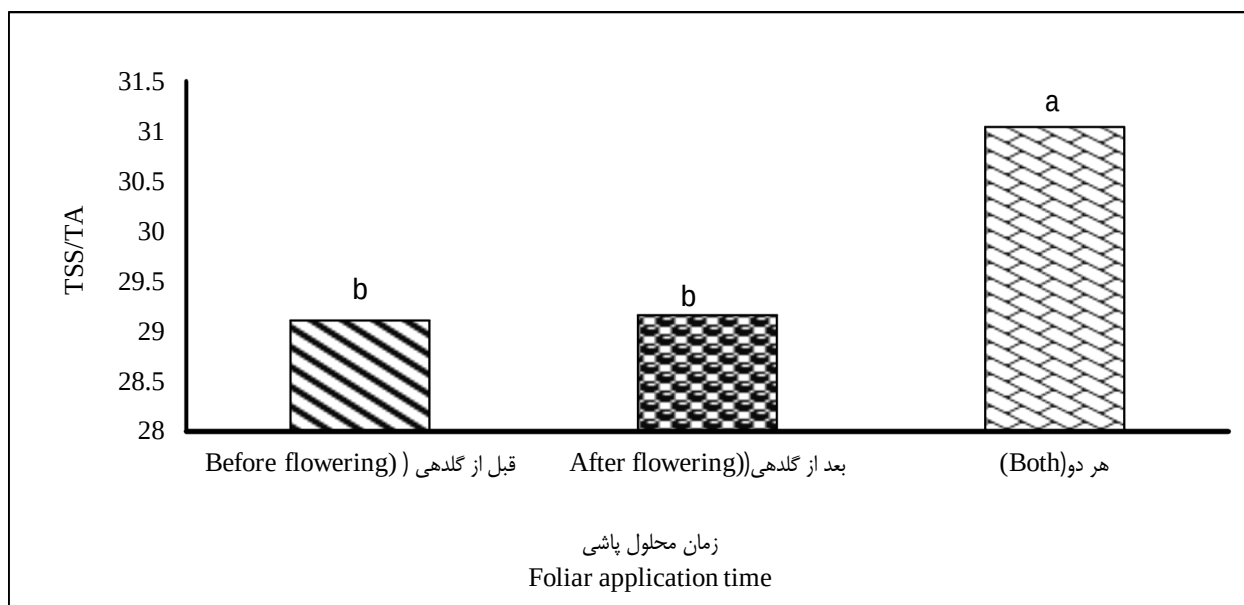
نسبت درصد کل مواد جامد محلول به اسید کل (TSS/TA)

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی بر نسبت درصد کل مواد جامد محلول به اسید کل در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌داری دارند (جدول 1). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف کود فروزینک بر نسبت TSS/TA انگور اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین نسبت TSS/TA (31/294) مربوط به تیمار 1000 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و کمترین نسبت TSS/TA (27/874)



شکل 5- تاثیر سطوح مختلف کود فروزینک بر نسبت TSS/TA در انگور رقم خوشناو

Figure 5 - Effect of different ferozinc treatments on ratio TSS/TA of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) with Duncan test



شکل 6- تاثیر زمان های مختلف محلول پاشی بر نسبت TSS/TA در انگور رقم خوشنایو
Figure 6 - Effect of different foliar times on the TSS/TA ratio of table grape cv. Khoshnaw
 Column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) with Duncan test

معنی داری وجود داشت، به طوری که بیشترین ویتامین ث (2/849 میلی گرم در 100 گرم آب میوه) مربوط به زمان هر دو (قبل و بعد از گلدهی) و کمترین ویتامین ث (2/733 میلی گرم در 100 گرم آب میوه) مربوط به زمان قبل از گلدهی بود (شکل 8).

بر اساس مقایسه میانگین‌ها، برهمکنش سطوح مختلف کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی بر میزان ویتامین ث انگور نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود داشت، به طوری که بیشترین میزان ویتامین ث مربوط به برهمکنش تیمارهای 1000 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و زمان هر دو (قبل و بعد از گلدهی) و کمترین میزان آن مربوط به برهمکنش تیمارهای شاهد (آب مقطر) و زمان‌های بعد از گلدهی و هر دو (قبل و بعد از گلدهی) بود (جدول 2).

واکنش آب میوه (pH)

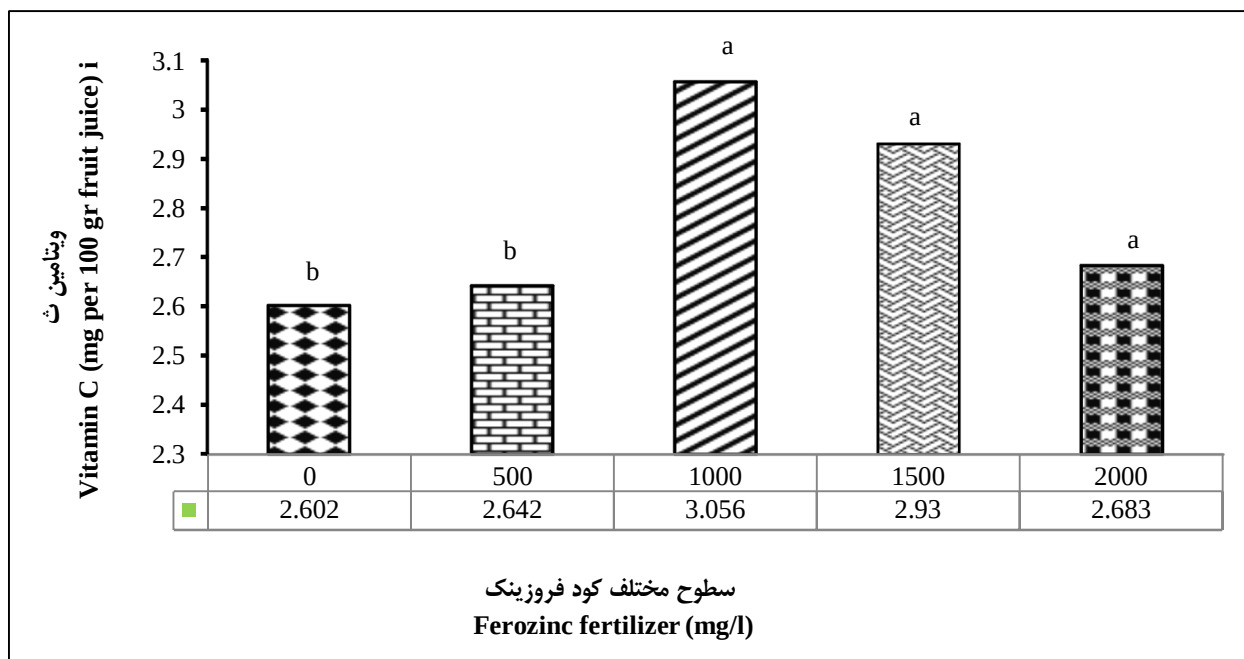
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کود فروزینک و برهمکنش سطوح مختلف کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی بر میزان واکنش آب میوه در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی داری دارند (جدول 1). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف کود فروزینک بر میزان واکنش آب میوه انگور اختلاف معنی داری وجود داشت، به طوری که بیشترین pH (3/678) مربوط به تیمار 1000 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و کمترین pH (3/522) مربوط به تیمارهای شاهد (آب مقطر) و 500 میلی گرم در لیتر کود فروزینک بود (شکل 9). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر واکنش آب میوه

نتایج پژوهش کاوسی و حسینی فرهی (15) نشان داد، محلول پاشی سولفات روی بر مواد جامد محلول، اسیدیته، شاخص رسیدگی، واکنش آب میوه و عملکرد انگور رقم سیاه در منطقه سی سخت معنی دار بود. باکا و همکاران (5)، نتیجه گرفتند که محلول پاشی عناصر روی، آهن و منگنز در زمان‌های مختلف ضمن افزایش عملکرد محصول، وزن، اندازه و دیگر خصوصیات حبه‌ها افزایش می‌یابد. همچنین درصد مواد جامد محلول حبه‌ها افزایش و اسیدیته کل کاهش پیدا کرد. نتایج تحقیقات پروویک (22)، نشان داد که محلول پاشی بور، منگنز، روی و مس در بهار، باعث افزایش عملکرد انگور و میزان قند حبه‌ها و کاهش اسیدیته کل شد.

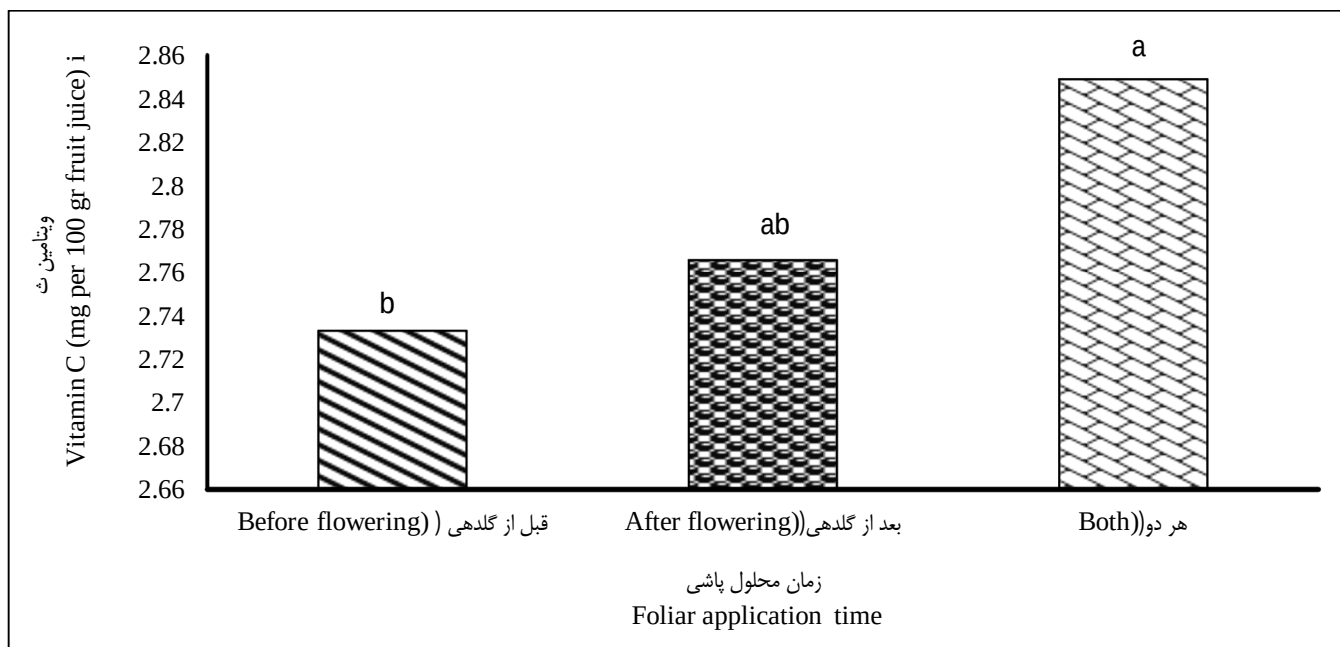
ویتامین ث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی و برهمکنش آنها بر میزان ویتامین ث در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی داری دارند (جدول 1). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف کود فروزینک بر میزان ویتامین ث انگور اختلاف معنی داری وجود داشت، به طوری که بیشترین ویتامین ث (3/056 میلی گرم در 100 گرم آب میوه) مربوط به تیمار 1000 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و کمترین ویتامین ث (2/602 میلی گرم در 100 گرم آب میوه) مربوط به تیمارهای شاهد (آب مقطر) بود (شکل 7). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر میزان ویتامین ث انگور بین زمان‌های مختلف گلدهی اختلاف

انگور بین زمان‌های مختلف گلدهی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی بیشترین pH (3/593) مربوط به زمان بعد از گلدهی و کمترین pH (3/567) مربوط به زمان هر دو (قبل و بعد از گلدهی) بود (شکل 10).



شکل 7- تاثیر سطوح مختلف کود فروزینک بر میزان ویتامین ث در انگور رقم خوشناو
Figure 7 - Effect of different ferozinc levels on the vitamin C of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test



شکل 8- تاثیر زمان‌های مختلف محلول پاشی بر میزان ویتامین ث انگور رقم خوشناو
Figure 8 - Effect of different foliar times on the vitamin C level of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test.

جدول 2- مقایسه میانگین برهمکنش سطوح مختلف کود فروزینک و زمان‌های مختلف محلول پاشی بر ویتامین ث انگور رقم خوشناو

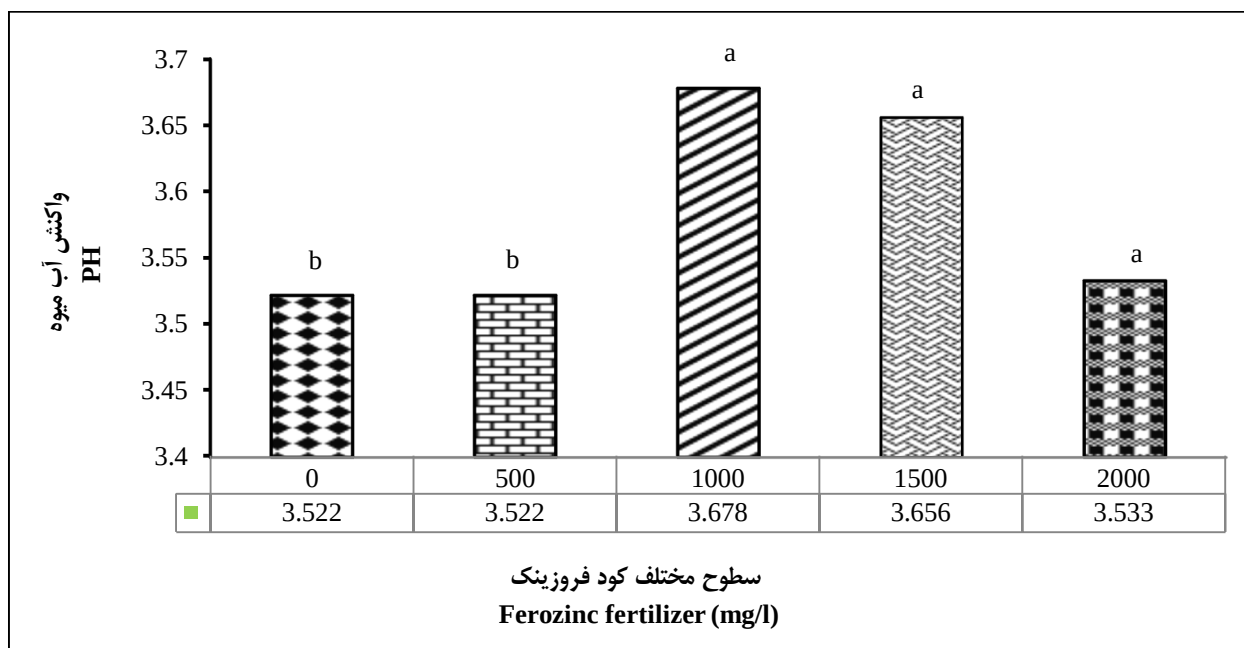
Table 2- Compare the average of interaction of different ferozinc fertilizer levels and different foliar times on the Vitamin C of table grape cv. Khoshnaw

فاکتورها Factors		زمان‌های مختلف محلول پاشی Different foliar times		
		قبل از گلدهی Before flowering	بعد از گلدهی After flowering	قبل و بعد از گلدهی Before and after flowering
سطوح مختلف کود فروزینک Different ferozinc fertilizer levels (mg/l)	0	2.707 ^{cd}	^d 2.550	^d 2.550
	500	2.627 ^{cd}	2.637 ^{cd}	^{cd} 2.663
	1000	2.800 ^{cd}	^a 3.133	^a 3.333
	1500	2.857 ^{bc}	2.867 ^{bc}	^{ab} 3.067
	2000	2.673 ^{cd}	2.643 ^{cd}	^{cd} 2.733

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نمی‌باشندNumbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$)

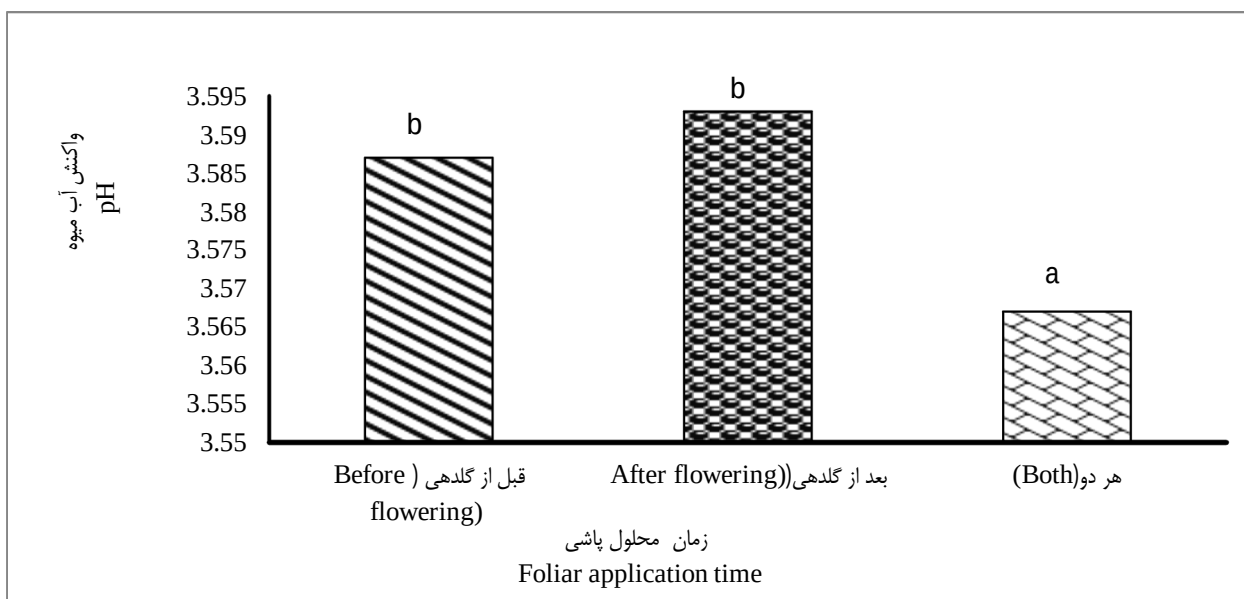
فروزینک و زمان بعد از گلدهی و کمترین pH مربوط به برهمکنش تیمارهای شاهد (آب مقطر) و زمان بعد از گلدهی و برهمکنش تیمارهای 500 میلی گرم در لیتر کود فروزینک و زمان هر دو (قبل و بعد گلدهی) بود (جدول 3).

بر اساس مقایسه میانگین‌ها، برهمکنش سطوح مختلف کود فروزینک و زمان‌های مختلف گلدهی بر میزان pH انگور نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که بیشترین pH مربوط به برهمکنش تیمارهای 1000 میلی گرم در لیتر کود



شکل 9- تاثیر سطوح مختلف کود فروزینک بر واکنش آب میوه (pH) انگور رقم خوشناو

Figure 9 - Effect of different ferozinc levels on Fruit juice reaction (pH) of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test.



شکل 10- تاثیر زمان‌های مختلف محلول پاشی بر واکنش آب میوه (pH) انگور رقم خوشناو
Figure 10 - Effect of different foliar times on fruit juice reaction (pH) of table grape cv. Khoshnaw
Column followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$) with Duncan test.

جدول 3- مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش سطوح مختلف کود فروزینک × زمان‌های مختلف محلول پاشی بر واکنش آب میوه (pH)
Table 2-Mean compare of interaction effect of different ferozinc fertilizer levels × different foliar times on fruit juice reaction. (pH)

فاکتورها Factors		زمان‌های مختلف محلول پاشی Different foliar times		
		قبل از گلدهی Before flowering	بعد از گلدهی After flowering	قبل و بعد از گلدهی Before and after flowering
سطوح مختلف کود فروزینک Different ferozinc fertilizer levels (mg/l)	0	^{b-e} 3.567	^e 3.467	^{c-e} 3.533
	500	3.500 ^{de}	3.600 ^{b-d}	^e 3.467
	1000	3.667 ^{ab}	^a 3.733	^{a-c} 3.663
	1500	3.667 ^{ab}	^{a-c} 3.633	^{ab} 3.667
	2000	3.533 ^{c-e}	3.533 ^{c-e}	^{c-e} 3.533

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) نمی‌باشند
Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.05$)

می‌تواند هم موجب بهبود کمیت و هم بهبود کیفیت محصول انگور گردد. لذا کاربرد کود فروزینک با غلظت 1000 میلی‌گرم در لیتر در قبل و بعد از گلدهی به منظور بهبود خصوصیات کمی و کیفی انگور در شرایط آبیاری رقم خوشناو در شرایط منطقه قابل توصیه می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر بیانگر این واقعیت است که فراهم نبودن شرایط بهینه تغذیه گیاه در تیمار شاهد موجب عدم دستیابی به عملکرد کمی و کیفیت بالای محصول گردیده و بنابراین در شرایطی که گیاه با ناهنجاری‌های تغذیه‌ای مواجه باشد، مصرف متعادل عناصر

منابع

- 1- Anymouse. 2014. Agriculture statistics, Kohgiluyeh and BoyerAhmad Agriculture Jihad Organization, Statistics Unit. (in Persian).
- 2- Agave N.A. 1985. Effects of boron on grapevines yield and quality. Horticultural Abstracts No. 54. 2.
- 3- Al-Dujaili J.A, Rahi H.S., and Ali N.S. 1994. Effect of foliar application of manganese, iron and zinc on yield and

- quality of grape (*Vitis vinifera* L.). The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 25 (1):109-117.
- 4- Aslani S., and Haghighat Afshar A. 1990. Nutrition and fertilization of grapevine. Anzali Publication. Ormia. Iran, 111 pp. (in Persian).
 - 5- Bacha M.A, Sabbah S.H., and El- Hamady M.A. 1995. Effect of foliar applications of iron, zinc and manganese on yield, berry quality and leaf mineral composition of Thompson seedless and Roumy red grape cultivars. Alexandria Journal of Agricultural Research. 40(3): 315- 331.
 - 6- Bahadur L. Malhi C.S., and Singh Z. 1998. Effect of foliar and soil application of zinc sulphate on zinc uptake, tree size, yield and fruit quality of mango. Journal of plant nutrition (U. S. A) 21: (3). P. 589-600.
 - 7- Bron J.C, Amblers J.E., Change R.L., and Foy C.D. 2003. Differential response of plant genotype to micronutrients pp.389-418. In: Journal of micronutrients in agriculture soil science society of America in corporation, Medison, Wisconsin.
 - 8- Daulta B.S, Kumar R., and Ahlawat V.P. 1985. A note on the effect of micronutrients spray on quality of Beuty seedless grapes. Horticultural Abstracts No. 56.
 - 9- Dixit C.K, Gamdagni R. Jindal R., and Jindal P.C. 1978. Effect of foliar application of zinc and iron on chlorosis and quainty of "Kknow"(Mandarin-hybrid). Hort. 10:13-19.
 - 10- Doulati baneh H. Taheri M. 2009. Effects of foliar application of nutrient elements on fruit set and quantitative and qualitative traits of keshmeshi grape cultivar. Seed and Plant Production Journal. 2(1): 103-11(in Persian with English abstract).
 - 11- Hosseini Farahi M. Goodarzi .K. Kavoosi B. 2009. Correction of zn deficiency and increasing of yield via trunk injection method on grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv Askari. Journal of Horticultural Sciences, Vol. 23, No. 2: 108-118 . (in Persian).
 - 12- Jacobs M.B. 1959. The chemical analysis of food and food products. D. Van Nostrand Co. Princetion, New Jersey, USA.
 - 13- Jalili Marandi R. 2003. Pomology, University Jahad of Western Azerbaijan publishing unit. p 251. (in Persian)
 - 14- Jamal omidi M. Esfahani M., and Carapetin J. 2006. Zinc and salinity intraction on agronomical traits, chlorophyll and prolin content in lowland Rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9(7): 1315-1319
 - 15- Kavoosi B., and Hosseini farahi M. 2009. The flower induction and the effects of Foliar Spraying of nitrogen, zinc and boron on performance and quality characteristics of black Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv Askari in sishkht city. Journal Of Research In Agricultural Science) 20: 4(1): 73-82.
 - 16- Malakouti M.J., and Tabatabaei M.J. 2008. The correct nutrition of fruit trees to achieve increased performance and improve the quality of horticultural products in calcareous soils of Iran. Publish Agricultural Training. karaj. p266. (in Persian).
 - 17- Mengel K., and Kirkby E.A. 2001. Principles of plant nutrition. 5th edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
 - 18- Mirtalebi S.H., Khajehpour M.R, Hosseini S.M., and Soleymani A. 2012. Effects of zinc sulphate on growth and development wheat cultivars in north Fars region. Journal of Plant Ecophysiology 4(2):47-60. (in Persian).
 - 19- Morshedi A. 2001. Effects of nitrogen, boron and zinc spray on grapevine fruit set. Proceedings of the 7th Iranian Soil Science Congress. Tehran, Iran. pp. 494-495. (in Persian).
 - 20- Saleh j, Malakouti M.J. 2001. The role of balanced fertilization in qualitative and quantitative improvement of black mandarin Bandar Abbas. Technical Publication No. 225 Research Institute of soil and water. Publishing publishing agricultural education. (in Persian).
 - 21- Pahlavan Rad M.R., Keykha G. Naroui Rad M. R. 2003. Effects of application of zn, fe and mn on yield yield component, nutrient concentration and uptake in wheat grain. Pajouhesh & Sazandegi No:79 pp: 142-150
 - 22- Perovic N. 1988. Effect of micronutrients applied through leaves in combination with different times and ways of applying phosphorus- potassium fertilizers on yield and quality of grapes. Arhiv- Zapoljoprivedne- Nauke, 49:143-152.
 - 23- Porro D. Stefanini M., and Dorigatti C. 1999. Using zinc and boron on grapes in a marginal area, Informatore- Agrario, 55(40): 59-63.
 - 24- Willia F.B. 1991. Nutrient deficiencies and toxicities in crop plant. Colleg of Agricultural and Natural Resources Texas Tech. University Lubbock.
 - 25- Yamdagni R, Singh D., and Jindal P.C. 1979. A note on effect of zinc sprays on yield and quality of Thompson seedless grapes. Indian Journal of Agricultural Research 13: 117-118.



Effect of Foliar Spray of Some Micronutrient Elements before and after Flowering on Quantitative and Qualitative Characteristics of Table Grape cv. Khoshnaw

Z. Davarkhah¹- B. Kavoosi^{2*}

Received: 03-09-2016

Accepted: 03-05-2017

Introduction: Table grape (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important small fruits in Iran produced in a wide range of climates from temperate to tropical regions. Khoshnaw cultivar is one of the most important table grapes in Iran. Vineyard soil in many parts of Iran is calcareous, leading to the decrease in the availability of micronutrients and exposure of vines to severe nutritional disorders. Lack of imbalanced fertilization is one of the reasons for the reduction in yield as well as fruit quality of vineyards. Iron, magnesium and zinc are essential nutrients that play an important role in increasing production and product quality. Zinc and iron deficiencies are the most common micronutrient disorders that have been observed in many vineyards of Iran. Other common deficiencies include manganese, boron, copper, and molybdenum. Most vineyards of Boyer Ahmad located in regions, where soil temperature is very low in spring, and obviously under these conditions and just when the grapevines need to make most of the mentioned elements, absorption of nutrients from the soil by the roots is reduced. However, there is high amount of lime ($\geq 60\%$) in the soil of the same area in this condition with high pH (7.9). Therefore, under this situation, vines cannot uptake iron and other micronutrients including zinc and boron. The fertilizer sources and time of their application are two important factors. The aim of this study was to determine the best concentration and application time of Ferozinc fertilizer on the quantitative and qualitative characteristics of table grape cv. khoshnaw.

Materials and Methods: The experiment was conducted to investigate the effect of foliar application of some micronutrient elements before and after flowering on quantitative and qualitative characteristics of table Grape cv. Khoshnaw in Yasuj during 2012. An experiment was conducted in private vineyards in Chitab district of BoyerAhmad region. The average annual precipitation was 676.7 mm. The minimum and maximum temperatures of this area varied from -7.8°C to 35.3°C during the year. The average minimum and maximum temperatures in growing season were 13°C and 29.5°C , respectively. 15-year-old own-rooted vines were trained by using head system. The vines were spaced 2.5×3 m. They were pruned by using spur pruning which left about 60 buds on each vine. The experiment was arranged as factorial based on randomized complete block design with two factors and four replications. The first factor included different levels of Ferozinc fertilizer (0, 500, 1000, 1500, and 2000 mg/l) and the second factor included different spraying times (before flowering, after flowering, and both times). The quantitative factors measured were the average of bunch weight, and average of fruit weight per bunch; and qualitative factors were percent of soluble solids (TSS percentage), the reaction of juice (pH), total acidity (TA percentage), TSS/TA ratio and vitamin C, respectively. The data were analyzed using MSTATC package program and means were separated using Duncan's Multiple Range Test at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$.

Results and Discussion: Results showed that the effects of Ferozinc fertilizer application were significant ($p \leq 0.01$) on the average of bunch weight, average of fruit weight per bunch, TSS/TA ratio, pH and vitamin C content. Moreover, the effect of foliar application time on all traits was significant, except for juice pH ($p \leq 0.01$). Based on the results of mean comparison, the interaction effect between different levels of Ferozinc fertilizer and times of foliar application on vitamin C content and pH of grape juice were significant ($p \leq 0.01$). The highest cluster weight (220.222 gr), average fruit weight per cluster (215.887 gr), TSS/TA ratio (31.29), pH (3.68) and vitamin C (2.849 mg/100 cc fruit juice) were obtained in the treatment containing 1000 mg/l Ferozinc fertilizer and both application times (before and after flowering).

Conclusions: In general, the results of the present study showed that the unavailability of optimal nutritional conditions in control treatment increased the quality of fruits. Therefore when the plant is faced with nutrition abnormalities, moderate consumption of elements could enhance quantity and quality of products. According to

1- Department of Horticulture Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

2- Assistant Professor, Horticulture Crops Research Department, Fars Agricultural Research and Natural Resource and education Center, AREEO, Shiraz, Iran

(*-Corresponding Author Email:kavoosi696@yahoo.com)

the results of this research, application of ferozinc fertilizer at concentration of 1000 ppm before and after flowering is recommended to improve the quantitative and qualitative characteristics of table grape cv. Khoshnaw under irrigation conditions in this area.

Keywords: Bunch weight, Flowering time, Vitamin C, Vineyard, Yield



تأثیر سطوح مختلف کم آبی بر برخی صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی

سید موسی موسوی¹ - مهرانگیز چهرازی^{2*} - اسمعیل خالقی³

تاریخ دریافت: 1395/08/05

تاریخ پذیرش: 1395/12/10

چکیده

با عنایت به کاهش نزولات جوی و پراکنش نامناسب بارندگی در طول سال، پدیده خشکی، یکی از معضلات فضای سبز شهری به شمار می‌رود. در واقع تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف کم آبی بر سیستم آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون چربی در گل جعفری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با 3 تکرار در دانشگاه شهید چمران اهواز در سال 1393 به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایش شامل آبیاری در 3 سطح ETcrop 100 درصد (بدون تنش)، 75ETc درصد (تنش متوسط) و 50ETc درصد (تنش شدید) و ارقام گل جعفری آفریقایی و فرانسوی بود؛ در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز)، غلظت مالون دی‌آلدهید و رنگیزه‌های فتوسنتزی، 63 روز پس از اعمال تیمار اندازه‌گیری شدند؛ که طبق نتایج: تیمار آبیاری تأثیر معناداری بر کلروفیل a، b، کل، شاخص محتوی کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و غلظت مالون دی‌آلدهید داشت. در حالیکه تفاوت معناداری بین دو گونه از گل جعفری بر هر یک از شاخص‌های اندازه‌گیری شده وجود نداشت. همچنین نتایج نشان داد میزان کلروفیل a و کلروفیل کل با افزایش تنش خشکی کاهش یافت، نتایج فعالیت آنزیمی نیز مشابه رنگیزه‌های فتوسنتزی و شاخص محتوی کلروفیل تحت تأثیر تنش خشکی، کاهش نشان داد. در کل طبق این پژوهش بین سطوح مختلف تیمار آبیاری از نظر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، غلظت مالون دی‌آلدهید، کلروفیل a، کلروفیل کل و غلظت کلروفیل تفاوت معنادار آماری وجود داشت به گونه‌ای که با کاهش مقدار آبیاری بر فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و غلظت مالون دی‌آلدهید افزوده شد و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش یافت. هرچند که تفاوتی بین دو گونه گل جعفری و اثر متقابل بین گونه و سطوح آبیاری از نظر شاخص‌های اندازه‌گیری شده به جز کلروفیل کل و کلروفیل b وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، آنزیم، تنش خشکی، تنش اکسیداتیو، مالون دی‌آلدهید

مقدمه

معضلات فضای سبز شهری به شمار می‌آید. در واقع تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه مانند مرحله جوانه‌زنی، استقرار گیاه چه و تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (5). در اثر تنش خشکی، فعالیت‌های فتوشیمیایی گیاه متوقف شده و محتوای کلروفیلی برگ تغییر می‌کند همچنین فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین در فرآیند فتوسنتز تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد (32). تنش خشکی باعث تولید اکسیژن فعال همراه با کاهش و تجزیه کلروفیل می‌شود که در طی تنش، کلروفیل‌ها در کلروپلاست تجزیه و ساختارهای تیلاکوئید ناپدید می‌گردند (26) بر اساس نظر اسپووتر و فنگ میر (2001) کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش خشکی مربوط به افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد در سلول می‌باشد. این رادیکال‌های آزاد

گل جعفری با نام علمی *Tagetes spp* (آفریقایی *T. erecta* L.؛ و فرانسوی *T. patula* L.) متعلق به خانواده آسترace می‌باشد که به عنوان گیاهی فصلی و یک ساله در فضای سبز مورد استفاده قرار می‌گیرد (18). روش تکثیر آن از طریق بذر بوده و pH مناسب محیط کشت آن 6-6/5 می‌باشد. با عنایت به کاهش نزولات جوی و پراکنش نامناسب بارندگی در طول سال پدیده خشکی یکی از

1، 2 و 3- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(*) - نویسنده مسئول: (Email: chehrizi_m@yahoo.com)

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.59172

اطلاعات کافی در خصوص تأثیر تنش کم آبی بر فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانی در مورد گیاهان زینتی، پژوهشی باهدف بررسی تأثیر تنش کم آبی بر میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون چربی، کلروفیل a، b، کلروفیل کل و شاخص محتوی کلروفیل برگ دو گونه از گل جعفری (آفریقایی و فرانسوی) جهت انتخاب گونه برتر انجام شد.

مواد و روش ها

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در سال 1393 به اجرا درآمد. سه رژیم مختلف آبیاری (100 شاهد، 75 و 50 درصد پتانسیل تبخیر و تعرق گیاه (ETcrop)) و دو گونه از گل جعفری (فرانسوی و آفریقایی) به عنوان تیمارهای آزمایش در نظر گرفته شد (2 و 24). در این آزمایش بذور دو گونه از گل جعفری (آفریقایی و فرانسوی) درون سینی های کشت با بستر کوکوپیت کشت گردید. بستر کشت مورد استفاده در این آزمایش شامل ماسه، کود حیوانی کاملاً پوسیده و خاک مزرعه با نسبت مساوی (1:1:1) بود (خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول 1 آمده است) پس از انتقال نشاء به منظور سازگاری گیاهان با محیط به مدت سه هفته بطور کامل آبیاری صورت گرفت. سپس گیاهان به مدت دو ماه با توجه به میزان تبخیر و تعرق صورت گرفته توسط گیاه تحت رژیم های آبیاری 100 (شاهد)، 75 و 50 درصد تبخیر و تعرق گیاه (ETc) قرار داده شدند (2 و 27) و در پایان آزمایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، غلظت کلروفیل و همچنین میزان غلظت مالون دی آلدئید برگ اندازه گیری شد و به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها، از نرم افزار MSTATC و جهت مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح 5 درصد استفاده گردید.

سبب پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می شوند و با کاهش میزان کلروفیل تغییرات زیادی در مقدار تولید در گیاهان به وجود می آید (40) همچنین تنش خشکی تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال های سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$) و هیدروکسید ($OH^{\cdot}$) را افزایش داده که تجمع آن ها در سلول می تواند منجر به تنش اکسیداتیو شود (31). در غیاب هرگونه مکانیسم حفاظتی، ROS می تواند از طریق آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک، متابولیسم طبیعی سلول را مختل کرده و به غشا سلولی آسیب رساند که در نهایت، موجب مرگ سلولی می شود (35). یکی از اثرات بارز رادیکال های آزاد اکسیژن بر سلامت سلول ها، تخریب غشاهای سلولی می باشد مالون دی آلدئید تحت تأثیر تخریب و پراکسیده شدن غشا سلولی آزاد شده پس می تواند بیانگر میزان تخریب غشا سلولی باشد (7). به منظور خنثی کردن ROS در گیاه سیستم های آنتی اکسیدانی آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) فعال می شوند (12). پاسخ آنتی اکسیدانی، فرآیندی مهم برای محافظت گیاهان در مقابل آسیب های اکسیداتیو است که در اثر طیف وسیعی از تنش های محیطی شامل شوری، خشکی، فلزات سنگین و سرما ایجاد می شود (31). مقاومت گیاه به تنش های مختلف محیطی ممکن است با سطح فعالیت آنزیم های مسئول به دام انداختن رادیکال های آزاد اکسیژن مرتبط باشد (30). پاسخ آنتی اکسیدان ها به کمبود آب، به شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. گونه های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القاشده توسط تنش کم آبی دارند که می تواند از طریق بالا بردن میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان افزایش پیدا کند (22). ارتباط بین افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و بالا رفتن مقاومت گونه های گیاهی تحت تنش های محیطی در چندین گونه گیاهی مانند برنج تأیید شده است (19). با عنایت به اثرات تنش کم آبی بر میزان کلروفیل و غلظت آن و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز و بیومس گیاه و همچنین نبود

جدول 1- برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Table 1- Selected physical and chemical characteristics of the studied soil.

بافت خاک	رس	سیلیت	شن	عمق نمونه	اسیدیته خاک	نیتروژن	پتاسیم	فسفر	کلر	ماده آلی	هدایت الکتریکی
Soil texture	Clay (%)	Silty (%)	Sand (%)	Sampling depth (cm)	Soil acidity	N (%)	P (mg/kg)	P (mg/kg)	CL (mg/l)	Organic matter (%)	EC (ds/m)
Sand clay	7.5	6.5	84	0-30	7.08	0.088	194.4	8	910	4.9	1.63

جذب در طول موج 240 نانومتر به واسطه کاتابولیزه شدن H_2O_2 طبق روش پیشنهاد شده بیرز و سیزر (1952) اندازه گیری شد. فعالیت این

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6) بر اساس کاهش

نتایج و بحث

1- آنزیم کاتالاز

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که (جدول 2) بین سطوح مختلف آبیاری از نظر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح 5 درصد تفاوت معنی داری وجود داشت در حالی که بین دو گونه گل جعفری تفاوت معنادار آماری مشاهده نشد همچنین اثر متقابل رقم و آبیاری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مؤثر نبود. با عنایت به جدول مقایسه میانگین (جدول 3) بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار آبیاری 50ETc درصد (تنش شدید) مشاهده شد که تفاوت معنی داری را با تیمار 100ETc درصد (بدون تنش) داشت و کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار شاهد (100ETc درصد) (23×10^{-8}) میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین) بود. درواقع با کاهش 50 درصد آب از حالت نرمال 3/13 برابر فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. ایلکایی و همکاران (2010) در رابطه با تأثیر تیمار آبیاری بر فعالیت آنزیم کاتالاز، نشان دادند که افزایش تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (15). محققین معتقدند که در شرایط تنش، در گیاه، غلظت آنزیم کاتالاز با هدف تجزیه پراکسید هیدروژن و افزایش تحمل در مقابل رادیکال های فعال اکسیژن افزایش می یابد. آنزیم کاتالاز به عنوان یک آنزیم محافظتی در سیستم دفاع آنتی اکسیدانت باعث تجزیه پراکسید هیدروژن شده و افزایش فعالیت آن در گندم پس از قرار گرفتن در معرض خشکی، گزارش شده است به طوری که ارقام حساس به خشکی فعالیت بیشتری نشان دادند (41). پژوهش ها در مورد چمن پوا نشان داد که با افزایش تنش خشکی فعالیت آنزیم CAT در ابتدا افزایش و سپس کاهش پیدا می کند (17). همچنین گزارشی حاکی از آن است که کاهش فعالیت آنزیم CAT منجر به تجمع پراکسید هیدروژن شده که این ماده می تواند با سوپر اکسید برای تولید رادیکال های آزاد هیدروکسیل واکنش دهد (10). مک کریسی و کندال (1989) و کافی و همکاران (2000) گزارش کردند که افزایش فعالیت کاتالاز جهت کاهش اثرات پراکسیداز در هنگام تنش های محیطی در گیاهان گندم، جو، سویا و نخود نقش مهمی دارد (30 و 24). نتایج ساعی و همکاران (2005) بر روی سورگوم علوفه ای نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر تنش خشکی نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش یافت که نتایج ما با آن آزمایش نیز مطابقت داشت (39).

2- آنزیم پراکسیداز

نتایج نشان داد که بین دو گونه گل جعفری از نظر میزان آنزیم پراکسیداز تفاوت معنادار آماری وجود داشت. همچنین برهمکنش تیمار آبیاری در گونه نیز بر میزان آنزیم پراکسیداز مؤثر نبود (جدول 2). با عنایت به جدول مقایسه میانگین (جدول 3) مشخص شد

آنزیم برحسب میکرومولار H_2O_2 در دقیقه در هر میلی گرم پروتئین و ضریب خاموشی $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ گزارش شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX , EC 1.11.1.7) بر اساس کاهش جذب در طول موج 470 نانومتر به روش همدا و کلین (1990) اندازه گیری شد (20).

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX , EC 11, 1, 11, 1) استخراج شده از عصاره برگ بر اساس کاهش جذب در طول موج 290 نانومتر به روش ناکانو و اسدا (1987) اندازه گیری شد (33).

اندازه گیری غلظت مالون دی آلدید (MDA)

میزان آسیب غشا توسط اندازه گیری میزان مالون دی آلدید (MDA) به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تخمین زده شد. غلظت مالون دی آلدید طبق روش واکنش تیوباربیتریک اسید (TBA) اندازه گیری شد.

اندازه گیری کلروفیل

جهت اندازه گیری کلروفیل به روش پیشنهادی آرنون (1967)، 0/1 گرم از بافت گیاهی توزین و با 5 میلی لیتر استون 80 درصد در هاون چینی ساییده شد سپس مخلوط همگن به دست آمده را درون فالکن ریخته و با اضافه کردن استون 80 درصد حجم عصاره به 10 میلی لیتر رسانده شد، پس از آن نمونه ها به مدت 20 دقیقه، در سانتریفیوژ با دور 5000 قرار داده شدند و در آخر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu-1201 میزان جذب روشنآور در طول موج های 663 و 645 قرائت گردید. محاسبه میزان کلروفیل کل از رابطه زیر صورت گرفت همچنین به منظور اندازه گیری شاخص محتوی کلروفیل از دستگاه کلروفیل متر (SPAD-502) استفاده گردید (3).

$$\text{Chlorophyll a (mg/g fresh weight)} = (12.7 A_{663}) - (2.69 A_{645}) / W \times V$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/g fresh weight)} = (22.9 A_{645}) - (4.68 A_{663}) / W \times V$$

$$\text{Chlorophyll a+b (mg/g fresh weight)} = (20.08 A_{645}) + (8.02 A_{663}) / W \times V$$

$$V = \text{حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)}$$

$$A = \text{جذب نور در طول موج های 663، 645 و 470 نانومتر}$$

$$W = \text{وزن تر نمونه بر حسب گرم}$$

ارزایی، آنزیم POD مهم ترین آنزیم برای افزایش مقاومت گیاه جو در مقابل تنش اکسایشی ناشی از کم آبی می باشد و گزارش کردند که فعالیت آنزیم POD در گیاه گندم با افزایش سطح تنش افزایش یافته است (1). همچنین در چمن پوا گزارش شده است که با پیشرفت خشکی، فعالیت آنزیم POD در ابتدا افزایش و سپس کاهش پیدا کرد (17). آنزیم POD نقش کلیدی در سم زدایی H_2O_2 حذف مالون دی آلدهید و حفظ ثبات و پایداری دیواره سلولی بازی می کند (21).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار آبیاری 50 درصد پتانسیل تبخیر و تعرق گیاه و کمترین فعالیت این آنزیم در تیمار آبیاری 100 درصد پتانسیل تبخیر و تعرق گیاه به دست آمد هر چند که تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر سطوح مختلف آبیاری مشاهده نشد. امینی و همکاران نشان دادند که تنش کم آبی در گیاه جو، موجب افزایش فعالیت آنزیم های APX, SOD, CAT و POD شد و همچنین بیان کردند در بین آنزیم های مورد

جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمار آبیاری و رقم بر صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی
Table 2- Analysis of variance effect of irrigation and species on biochemical traits of of two species *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*

میانگین مربعات Mean of Squares (MS)					
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate Peroxidase	مالون دی آلدهید Malondialdehyde	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase
Block بلوک	2	2.71×10^{-11} ns	0.0021 ns	3.175×10^{-11} ns	9.734×10^{-10} ns
Irrigation آبیاری	2	1.49×10^{-9} **	0.021 **	3.87×10^{-11} *	1.733×10^{-9} ns
Species گونه	1	3.89×10^{-11} ns	0.0096 ns	9.90×10^{-12} ns	3.892×10^{-11} ns
گونه × آبیاری	2	1.620×10^{-9} ns	0.0041 ns	3.37×10^{-10} ns	1.920×10^{-9} ns
Irrigation × Species					
Error خطا	10	9.4×10^{-12}	0.00025	4.48×10^{-13}	2.7×10^{-11}
(C.V%)		11.82	14.64	16.8	14.9

ns, *, **, به ترتیب تفاوت غیر معنادار و معنادار در سطح 5 و 1 درصد
n.s, *, **: non-significant and Significant at 1 and 5%, respectively

ادامه جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمار آبیاری و رقم بر صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی
Continued Table 2- Analysis of variance effect of irrigation and species on biochemical traits of two species *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*

میانگین مربعات Mean of Squares (MS)						
منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll (a)	کلروفیل b Chlorophyll (b)	کلروفیل کل Chlorophyll (Total)	غلظت کلروفیل Chlorophyll concentration	کلروفیل کل Chlorophyll (Total)
Block بلوک	2	0.09 *	0.01 ns	0.006 ns	50.75 ns	0.006 ns
Irrigation آبیاری	2	1.48 **	0.5 *	0.489 **	117.55 *	0.489 **
Species گونه	1	0.03 ns	0.02 ns	0.219 **	37.78 ns	0.219 **
گونه × آبیاری	2	0.51 **	0.1 ns	0.061 ns	6.23 ns	0.061 ns
Irrigation × Species						
Error خطا	10	0.01	0.0072	0.013	23.3	0.013
(C.V%)		15.96	11.81	21.08	14.41	21.08

ns, *, **, به ترتیب تفاوت غیر معنادار و معنادار در سطح 5 و 1 درصد
n.s, *, **: non-significant and Significant at 1 and 5%, respectively

تفاوت معناداری وجود نداشت. کمترین و بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات به ترتیب مربوط به تیمارهای آبیاری کامل (شاهد) و 50 درصد پتانسیل تبخیر و تعرق گیاه (50ETC درصد) بود. با کاهش مقدار آب آبیاری از 100ETC درصد به 50ETC درصد میزان فعالیت

3- آنزیم آسکوربات پراکسیداز

با توجه به جدول 2، بین سطوح مختلف آبیاری از نظر آنزیم آسکوربات پراکسیداز تفاوت معناداری در سطح 1 درصد مشاهده شد درحالی که بین دو گونه از گل جعفری و برهمکنش گونه در آبیاری

شرایط تنش است به طوری که هرچه این نسبت بیشتر باشد سلول از پتانسیل ردوکس مطلوبی برخوردار بوده و مکانیسم‌های تدافعی آن در شرایط تنش بهتر عمل می‌کند (9). آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب گلوکاتیون و آسکورات در چرخه‌های بسیار مهمی نظیر گلوکاتیون-آسکورات (14)، مه‌لر (4) و گزانتوفیل (23) حضور دارند. آنتی‌اکسیدان‌های مذکور به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های درگیر در این چرخه‌ها عمل می‌کنند به عبارت دیگر فرم احیای این آنتی‌اکسیدان‌ها پتانسیل هیدروژن لازم برای احیای کامل پراکسید هیدروژن را در چرخه‌های گلوکاتیون-آسکورات و مه‌لر تأمین می‌کنند همچنین فرم احیا آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب مذکور در چرخه گزانتوفیل هیدروژن لازم برای احیا کامل اکسیژن اتمسفری و تبدیل آن به آب نقش بسیار مؤثری دارند. هرگاه آنتی‌اکسیدان‌های اسکورات و گلوکاتیون کاهش یابند و یا نسبت احیا به کل آن‌ها در حد پائین باشد سبب کاهش کارایی مکانیسم‌های مذکور شده و انواع اکسیژن فعال تجمع می‌یابد (16).

آنزیم آسکورات پراکسیداز به میزان 3/81 برابر افزایش یافت. در مطالعه مشابهی گزارش شده است که تحت شرایط شدید تنش خشکی، رقم مقاوم به خشکی گندم فعالیت بالاتری از آسکورات پراکسیداز را در مقایسه با رقم حساس به خشکی نشان داد (29). در بررسی انجام شده روی چمن پوا مشخص شد که فعالیت آنزیم آسکورات پراکسیداز در مواجه شدن با تنش خشکی افزایش یافت (8)؛ که نتایج ما با آن نیز مطابقت داشت. پژوهش‌ها نشان داد که گلوکاتیون و اسکورات از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب می‌باشند که در اکثر اندامک‌های سلول حضور دارند (41). این آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی واکنش مستقیم با رادیکال‌های فعال اکسیژن نظیر سوپراکسید و هیدروکسیل را داشته و آن‌ها را جمع‌آوری می‌کنند (31). در واقع آنزیم آسکورات پراکسیداز از طریق سیکل آسکورات - گلوکاتیون باعث متابولیسم شدن H_2O_2 می‌شود. همچنین سایر پژوهش‌ها حاکی از آن است که نسبت احیا به اکسید آنتی‌اکسیدان‌های گلوکاتیون و اسکورات بیانگر وضعیت سلول در

جدول 3- مقایسه میانگین اثر سطوح آبیاری بر برخی صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی

Table 3- Comparison of mean effect of level irrigation on some biochemical traits of two species *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*

آبیاری Irrigation	پراکسیداز Peroxidase ($\mu M H_2O_2 \min^{-1} mg^{-1}$ Pro)	کاتالاز Catalase ($\mu M H_2O_2 \min^{-1}$ mg^{-1} Pro)	مالون دی آلدئید Malondialdehyde ($nM g^{-1} F W$)	آسکورات پراکسیداز Ascorbate Peroxidase ($\mu M H_2O_2 \min^{-1} mg^{-1}$ Pro)
100%ET _C	19×10 ⁻⁶ b	23×10 ⁻⁸ b	0.495 ^b	11×10 ⁻⁶ b
75%ET _C	30×10 ⁻⁶ ab	35×10 ⁻⁸ ab	0.1065 ^{ab}	25×10 ⁻⁶ ab
50% ET _C	53×10 ⁻⁶ a	72×10 ⁻⁸ a	0.1683 ^a	42×10 ⁻⁶ a

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف یکسان بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح 5 درصد معنادار نیستند.

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

ادامه جدول 3- مقایسه میانگین اثر سطوح آبیاری بر برخی صفات بیوشیمیایی دو گونه گل جعفری آفریقایی و فرانسوی

Continued Table 3- Comparison of mean effect of level irrigation on some biochemical traits of two species *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*

آبیاری Irrigation	کلروفیل a Chlorophyll (a) ($mg / g^{-1} F W$)	کلروفیل b Chlorophyll (b) ($mg / g^{-1} F W$)	غلظت کلروفیل chlorophyll concentration	کلروفیل کل Chlorophyll (Total) ($mg / g^{-1} F W$)
100%ET _C	1.308 ^a	0.838 ^a	38.192 ^a	1.085 ^a
75%ET _C	0.760 ^b	0.535 ^{ab}	32.875 ^{ab}	0.760 ^b
50% ET _C	0.314 ^c	0.258 ^b	29.403 ^b	0.515 ^c

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف یکسان بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 5 درصد معنادار نیستند.

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple range test..

وجود نداشت. طبق جدول مقایسه میانگین (جدول 3) بیشترین میزان مالون دی آلدئید در تیمار آبیاری 50 پتانسیل تبخیر و تعرق گیاه و کمترین آن در تیمار آبیاری 100 پتانسیل تبخیر و تعرق گیاه به دست آمد. به عبارت دیگر با کاهش مقدار آب بر غلظت مالون دی آلدئید

4- غلظت مالون دی آلدئید (MDA)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که (جدول 2) مقدار آبیاری بر غلظت مالون دی آلدئید، در سطح 1 درصد مؤثر بود درحالی که بین دو گونه از گل جعفری و برهمکنش گونه در آبیاری تفاوت معناداری

گردید. فتوستتزی یکی از فرایندهای مهم فیزیولوژیکی گیاه می باشد که دوام آن و حفظ کلروفیل برگ از جمله شاخص های فیزیولوژیکی مقاومت به تنش می باشد (13). تنش خشکی باعث کاهش و تجزیه کلروفیل و همچنین تولید اکسیژن فعال می شود که در طی تنش، کلروفیل ها در کلروپلاست تجزیه و ساختارهای تیلاکوئید ناپدید می گردند (44) نتایج تحقیقات نشان داده است که تنش خشکی باعث ایجاد اختلال در سیستم های آنزیمی، کاهش دهنده فعالیت اکسیژن فعال و افزایش پراکسیداسیون چربی ها و در نتیجه خسارت به غشای سلولی و تخریب رنگ دانه ها نیز می گردد همچنین کاهش میزان کلروفیل، می تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف بیوستتزی کلروفیل نیز باشد که نشان دهنده وسعت آسیب های اکسیداتیو است (3). پازکی (2001) با مطالعه تأثیر تنش آبی بر بخش نوری فتوستتزی و سیستم رنگیزه ای، به این نتیجه رسید که با افزایش شدت تنش آبی، روند تخریب رنگیزه های کلروفیل با سرعت بیش تری صورت می گیرد (36). پژوهشگران اظهار داشتند با افزایش فواصل آبیاری در گیاه آمارانتوس زینتی (25) و ذرت (34) شاخص کلروفیل کاهش یافت. طبق پژوهش ها آنزیم های کلروفیلاز و پراکسیداز از عوامل مؤثر در کاهش کلروفیل در شرایط تنش رطوبتی هستند همچنین ممکن است کاهش و تجزیه کلروفیل در شرایط طولانی مدت به دلیل کاهش جریان نیتروژن به بافت ها و فعالیت نیترات ردوکتاز باشد (38).

نتیجه گیری کلی

نتایج نشان داد که تیمار آبیاری در تمام شاخص های اندازه گیری شده به جز آنزیم پراکسیداز تأثیر معنی دار داشته و بین دو گونه از گل جعفری فقط در صفت کلروفیل کل اختلاف معنی داری مشاهده شد. درواقع با کاهش سطح آبیاری از 100ETc درصد به 50ETc درصد میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و غلظت مالون دی آلدئید افزایش و میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و شاخص کلروفیل کاهش یافت.

افزوده شد. این نتایج با گزارش های سیرام و همکاران مبنی بر افزایش مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی مطابقت داشت (37). این محققین معتقدند زمانی که دفاع آنتی اکسیدانتی کاهش و یا تشکیل رادیکال های آزاد افزایش می یابند، تنش های اکسیداتیو پدید می آید که می توانند منجر به افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع لیپیدها، تخریب غشاء لیپیدها و در نتیجه تولید آلدئیدهای گوناگونی از جمله مالون دی آلدئید شود. مالون دی آلدئید به عنوان یکی از محصولات اصلی اکسیداسیون غشا است که تجمع آن نشان دهنده اثرات مخرب رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد و این بیومارکر با افزایش تنش خشکی افزایش می یابد (11). در تنش های کم آبی رادیکال های آزاد تولید شده که با دخالت و تغییر در فرایندهای بیولوژیک و تبدیل آن ها به فرایندهای غیرقابل کنترل، سبب تولید سلول های تخصصی جدید و خسارت به بخش های مختلف سلول (DNA، پروتئین ها و لیپیدها) می شوند که در نهایت میزان فتوستتزی را کاهش می دهند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را می توان به عنوان نشانه ای از آسیب اکسیداتیو در نظر گرفت و اغلب از آن به عنوان شاخصی برای تعیین میزان آسیب وارده به غشا تحت تنش استفاده می شود (28).

5- رنگیزه های فتوستتزی و شاخص محتوی کلروفیل

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 1) اثر سطوح مختلف آبیاری، بر مقدار رنگیزه های فتوستتزی شاخص محتوی کلروفیل تأثیر معنی دار داشته و همچنین بین دو گونه از گل جعفری از نظر کلروفیل کل اختلاف معنی داری وجود داشت. برهمکنش آبیاری و گونه نیز فقط بر کلروفیل a مؤثر بود. طبق جدول مقایسه میانگین ها، کمترین میزان شاخص محتوی کلروفیل با مقدار 29/403 و کمترین میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل به ترتیب با مقدار 0/31467، 0/2585 و 0/5153 در تیمار 50ETc درصد و بیشترین میزان شاخص محتوی کلروفیل با مقدار 38/192 و بیشترین میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل به ترتیب با مقدار 1/30867، 1/0185، 1/0850 میلی گرم بر گرم وزن تر برگ و در تیمار 100ETc درصد مشاهده

منابع

- 1- Amini Z., Hadad R., and Moradi F. 2008. The effect of drought stress on antioxidant enzymes activity in reproductive growth stages (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 46, 74-65.
- 2- Arji A. 2003. Effects of drought stress on physiological characteristics, morphological and biochemical some olive varieties. Thesis Faculty of Agriculture. Tarbiat Modarres University, 213 p. (in Persian)
- 3- Arnon A. N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121.
- 4- Asada K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431.
- 5- Bacelar E. A., Santaos D. L., Moutinho-Pereira J. M., Lopes J. I., Goncalves B. C., Ferreira T. C., and Correia C. M. 2007. Physiological behavior, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. *Plant Soil*, 292 (1-2), 1-12.

- 6- Ben Ahmed C., Ben Rouina B., Sensoy S., Boukhris M., and Ben Abdallah F. 2009. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 67(2), 345-352.
- 7- Bhattacharjee S., and Mukherjee A. K. 2002. Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology*, 30(2), 279-287.
- 8- Bian S., and Jiang Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, 120(2), 264-270.
- 9- Breusegem F.V., Vranova E., Dat J.F., and Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414.
- 10- Cook D., Fowler S., Fiehn, O. and Thomashow, M. F. 2004. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of Arabidopsis. *Plant Biology, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15243-15248.
- 11- Cunhua S., Joui-jie S., Dan W., Wei B., and Sun Dong L. 2011. Effects on physiological and biochemical characteristic of medicinal plant pigweed by drought stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 4041-4048.
- 12- Dabrowska G., Kata A., Goc A., Hebda M.S., and Skrzypek E. 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 49(1), 7-17.
- 13- Draikewicz M. 1994. Chlorophyllase occurrence functions, mechanism of action, effect of extra and internal factors. *Photosynth*, 30, 321-337.
- 14- Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106(2), 119-133.
- 15- Eilkaei M. N., Habibi F., Paknejad F., Gol zardi F., Mohebbati M.A., Mashhadi akbar bojar, M. and Taleghani, F. 2010. The effects of foliar application of selenium on drought tolerance in different cultivars of red beans. *Agronomy and Plant Breeding*, 5 (2), 61-71. (in Persian)
- 16- Esfandiari A., Mahboob S., Shakiba M., and Lyary H. 2009. The role of the Treasury and proline in water-soluble antioxidants protect cell membranes in water stress. *Journal of Agricultural Science*, 19 (2), 139-147. (in Persian)
- 17- Fu, J. and Huang, B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environment Experimental Botany*, 45(2), 105-114.
- 18- Ghasemi Ghehsareh, M., and Kafi M. 2010. *Practical potting, Practical potting*, Volume I, Tenth Edition, p. 55. (in Persian)
- 19- Guo Z., Ou W., Lu S., and Zhong Q. 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology Biochemistry*, 44(11), 828-836.
- 20- Hemeda H.M., and Kellin B.P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. *Journal of food Science*. 55(1), 184-185.
- 21- Hojati M., Modarres-Sanavy S. A. M., Karimi M., and Ghanati F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. *Acta Physiologia Plantarum*, 33(1), 105-112.
- 22- Hosseini Boldaji S. A., Khavari-Nejad R. A., Sajedi R. H., Fahimi H., and Saadatmand S. 2012. Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 34(3), 1177-1186.
- 23- Jiang C. D., Gao H. Y., Zou, Q., Jiang G. M., and Li L. H. 2006. Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. *Environmental and Experimental Botany*, 55(1), 87-96.
- 24- Kafi M., and Mahdavi Damghani, a. 2000. *Mechanisms of resistance of plants to drought stress*. Press Ferdowsi University of Mashhad. The second edition, p 472. (in Persian)
- 25- Kamali M., Goldani M., and Farzaneh A. 2013. The effect of different irrigation regimes on growth parameters and photosynthesis and hydrogen peroxide in *Amaranthus tricolor*. *Journal of Soil and Water (Agricultural Science and Technology)*, 26(2), 309-318. (in Persian)
- 26- Kendall E. J., and McKersie B. D. 1989. Free radical and freezing injury to cell membrane of winter physiol. *Physiologia Plantarum*, 76(1), 86-94.
- 27- Khaleghi E., arzani K., Moalemi N., and barzegar M. 2014. Effect of kaolin on fluorescence and chlorophyll content in olive (*olea europaea* L.) cultivars under water stress conditions Dezful. *Journal of Plant (Journal of Agriculture)*, 37 (2), 139-127. (in Persian)
- 28- Khan M. H., and Panda S. K. 2008. Alternations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologia Plantarum*, 30(1), 81-89.
- 29- Khanna-Chopra R., and Selote D. S. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2), 276-283.

- 30- Mckersie B. D., Bowley S. R., Harjanto E., and Leprince O. 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 111(4), 1177-1181.
- 31- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- 32- Monakhova O. F., and Chernyadev I. I. 2002. Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. *Applied Environmental Microbiology*, 38(4), 373-380.
- 33- Nakano Y., and Asada K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1): 131-140.
- 34- O'Neill P., Shanahan J.F., and Schepers J.S. 2006. Use of chlorophyll fluorescence differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science*. 46: 681-687
- 35- Ozkur O., Ozdemir F., Bor M., and Turkan I. 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf to drought. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 487-492.
- 36- Pazoki A. 2001. Evaluation and measurement of water stress on physiological traits and drought resistance indexes of two cultivars of rapeseed. Crop Physiology PhD thesis. Islamic Azad University, Science and Research Branch of Ahvaz. 258. (in Persian)
- 37- Sairam R., Rao K., and Srivastava C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163(5), 1037-1046
- 38- Salehi M., Kouchaki A., and Nasiri mahallati M. 1382. The amount of nitrogen and chlorophyll content as an indicator of drought stress in wheat. *Journal of agricultural research*, 1(2), 205-199.
- 39- Sayee M., Habibi D., Mashhadi akbar bojar M., Mahmoudi A., and Ardakani M.R. 2005. Determine the level of activity of antioxidant enzymes as a parameter in determining forage sorghum varieties resistant to drought stress. *Background papers of the International Conference on Life Sciences Iran*. (in Persian)
- 40- Schutz M., & Fangmeier A. 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO₂ and water limitation. *Environmental Pollution*, 114(2): 187-194.
- 41- Simova-stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., and Fel1er, U. 2010. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant physiology Biochemistry*, 48(2), 200-206.
- 42- Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion Plant Biologica*, 3(3), 229-235.
- 43- Stewart R.R.C., and Bewley J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 65(2), 245-248.
- 44- Xiao X., Xu X., and Yang F. 2008. Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cothayana* populations. *Silva Fennica*, 42, 705-719.



The Effect of Water Deficit Different Levels on Antioxidant System and Lipid Peroxidation in two Species *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* of Marigold

S. M. Mousavi¹- M. Chehrazhi^{2*}- E. Khaleghi³

Received: 26-10-2016

Accepted: 280-02-2017

Introduction: With regard to decrease of precipitation and poor distribution of rainfall during the dry phenomenon of urban, green spaces face problems. In fact, one of the most important environmental stress is drought stress at different stages of plant growth such as seed germination, seedling establishment and crop production. The effect of drought stress, plants photochemical activity ceased Calvin cycle enzymes and chlorophyll content also varies in the process of photosynthesis under drought stress. Under drought stress, reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radicals ($O_2^{\cdot -}$) and hydroxide ($OH^{\cdot}$) increase their accumulation in cells that can lead to oxidative stress. To neutralize ROS, antioxidant enzymes systems in plant such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) are active. The response of antioxidants depends on the lack of water, the intensity of the stress and the type of plant species. Also, it is well known that photosynthetic systems in higher plants are most sensitive to drought stress. Indeed, drought is one of the factors affecting photosynthesis and chlorophyll content. Some of researchers reported that chlorophyll might estimate influence of environmental stress on growth because these parameters were closely correlated with the rate of carbon exchange. The aim of this study was an investigation of effect of water deficit different levels on antioxidant system and lipid peroxidation in two species of marigold. Therefore, an experiment was carried out as factorial in a randomized complete block design with three replication at Shahid Chamran University of Ahvaz in 2014 year.

Materials and Methods: Experimental treatments were irrigation with three levels: 100% ETcrop (no stress), 75% ETcrop (moderate stress) and 50% ETcrop (severe stress) and two species of marigold (African and French). Catalase activity decreased absorption at a wavelength of 240 nm through catabolizing on the basis of H_2O_2 according to Beers and Sizer (1952). Peroxidase activity decreased absorption at a wavelength of 470 nm that was measured by using Hemeda and Kelen (1990). Ascorbate peroxidase enzyme extracted from leaf based on defects in the wavelength of 290 nm that was measured by Nakano and Asada (1987). The final product of membrane lipid peroxidation malondialdehyde concentration as the reaction thiobarbituric acid (TBA) was measured. Also, chlorophyll a, b and total chlorophyll were calculated by Arnon's equations and chlorophyll content index (C.C.I) was measured by chlorophyll content meter (SPAD-502).

Results and Discussion: Results of analysis of variance showed that irrigation treatment had significant effect on chlorophyll a, total chlorophyll (Chl a+b), chlorophyll content index and catalase peroxidase, ascorbate peroxidase enzymes activity and malondialdehyde while there was not significantly difference between two species of marigold on any of the measured biochemical characteristics. Also, results revealed that amount of leaf chlorophyll a and total chlorophyll (chl a+b) were reduced by increasing water deficit. In fact, amount of total chlorophyll, chlorophyll a, b and chlorophyll content index were higher in plants that were received 100% ETcrop than 75 and 50% ETcrop. The results of enzyme activity were similar to total chlorophyll and chlorophyll a and b. Amount of decreased chlorophyll a and total chlorophyll in plants were received 50% ETcrop were 24% and 47.46%, compared with 100% ETcrop, respectively.

Conclusion: Result showed that different levels of irrigation were significantly different at 5% level on catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase enzymes activity and malondialdehyde concentration. Catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase enzymes activity and malondialdehyde concentration were increased by reducing the amount of irrigation while there were no different between two species of marigold and interaction between species and irrigation was not effective on measured indexes.

Keywords: Drought stress, Enzymes, Irrigation, Malondialdehyde, Oxidative stress

1, 2 and 3- Graduated and Assistant Professors, Department of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahvaz

(*- Corresponding Author Email: chehrazhi _m@yahoo. com)



تعیین دماهای کاردینال چمن سردسیری و دو گونه علف هرز غالب آن

مرجان دیانت^{*1}

تاریخ دریافت: 1395/09/03

تاریخ پذیرش: 1396/06/15

چکیده

واکنش جوانه‌زنی بذر دو گونه چمن فتان قرمز (*Festuca rubra* L.) و چچم دائمی (*Lolium perenne* L.) و دو گونه علف هرز غالب آنها هفت بند (*Polygonum aviculare* L.) و شیر تیغی (*Sonchus oleraceus* L.) به دماهای 2، 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35، 40 و 45 درجه سانتیگراد در ژرمیناتور مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با 4 تکرار انجام شد. جهت تعیین دماهای کاردینال (پایه، مطلوب و بیشینه) از مدل‌های رگرسیون غیر خطی (خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه 2) بین سرعت جوانه‌زنی و دماهای مختلف استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در سطح یک درصد تحت تاثیر دما قرار گرفتند. مدل خطوط متقاطع در گونه‌های چچم دائمی، فتان قرمز و شیر تیغی و مدل دندان مانند در گونه هفت بند به خوبی سرعت جوانه‌زنی را نسبت به دما توصیف نمودند و با توجه به کمترین جذر میانگین مربعات خطا و بیشترین تبیین بهترین برازش را برای جوانه‌زنی بذور مورد بررسی نشان دادند. دمای پایه، مطلوب و بیشینه به ترتیب برای چچم دائمی 4/12، 24/66، 43/27 برای فتان قرمز 2/0، 24/86، 43/48 برای هفت بند 2/95، 19/94، 22/21 و 44/97 و برای شیر تیغی 2/0، 17/77، 44/86 درجه سانتیگراد به دست آمد. گونه فتان قرمز به علت پایین‌تر بودن دمای پایه نسبت به چچم دائمی و علف‌های هرز زودتر جوانه زد بنابراین استفاده از چمن‌های اسپورته که دارای نسبت بالاتری بذر فتان قرمز می‌باشند موجب می‌شود چمن بتواند سریعتر از گونه‌های هفت بند و شیر تیغی مستقر شده و در رقابت با علف‌های هرز پیروز باشد. با استفاده از نتایج این تحقیق می‌توان کارایی کنترل علف‌های هرز را در چمن بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: چچم دائمی، درصد جوانه‌زنی بذر، سرعت جوانه‌زنی، فتان قرمز، مدل‌های رگرسیونی

مقدمه

فضای سبز و تخریب چمن سنگ فرش آسفالت و ... می‌گردد (7). گونه‌های علف‌های هرز در برهه‌های زمانی متفاوتی از فصل سبز می‌شوند و الگوی سبز شدن ویژه‌ای برای هر گونه دیده می‌شود (4). الگوی سبز شدن علف‌های هرز مشخص کننده زمان کاربرد علف‌کش و چگونگی کنترل علف‌های هرز خواهد بود. این موضوع کمک بزرگی در جلوگیری و یا به حداقل رساندن اثر علف‌های هرز بر کیفیت و میزان رشد چمن دارد. پیش بینی زمان سبز شدن علف‌های هرز می‌تواند در کاهش رقابت علف‌های هرز با چمن و همچنین استفاده از برنامه‌های مدیریتی مناسب ما را یاری دهد (9). موضوع کمک بزرگی در جلوگیری و یا به حداقل رساندن اثر علف‌های هرز بر کیفیت و میزان رشد چمن دارد. پیش بینی زمان سبز شدن علف‌های هرز می‌تواند در کاهش رقابت علف‌های هرز با چمن و همچنین استفاده از برنامه‌های مدیریتی مناسب ما را یاری دهد (9).

جوانه‌زنی مرحله‌ای بحرانی در چرخه زندگی گیاهان است و اغلب پویایی جمعیت را کنترل می‌کند. این فرایند فیزیولوژیکی تحت تاثیر عامل مختلفی مانند دما، رطوبت و نور قرار می‌گیرد که در این میان

فضاهای سبز از لحاظ زیست محیطی به عنوان جریان‌های حیاتی شهرها محسوب می‌شوند و با توجه به رشد روز افزون شهرنشینی، ایجاد فضاهای سبز کلان به عنوان مهمترین تعدیل کننده زیست محیطی شهرها، ضروری می‌باشد. چمن‌ها بخش عمده‌ای از فضای سبز را تشکیل می‌دهند که در صورت مدیریت نامناسب و ضعیف شدن آن‌ها، مورد هجوم علف‌های هرز قرار می‌گیرند. احداث و نگهداری محصولاتی مانند تولید چمنکاری‌ها در فضای سبز که نیاز آبی بالایی دارند مستلزم صرف هزینه‌های گزاف برای شهرداری‌ها می‌باشد. رشد علف‌های هرز این گیاهان مزاحم در فضای غیر زراعی نظیر فضای سبز عجیب و نامناسب به شمار می‌رود و باعث مصرف آب مورد نیاز چمن، اختلال در نظم موجود در

1- استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و

تحقیقات، تهران، ایران

(Email: mdianat@ut.ac.ir)

(*) - نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.60317

8/7 درجه سانتی گراد قرار داشت و دمای مطلوب آنها در فاصله دمایی 23 تا 30/5 درجه سانتیگراد متغیر بود. علف‌های هرز هفت بند⁸ و شیر تیغی⁹ از مهمترین علف‌های هرز در چمن سردسیری کشت شده در تهران هستند. بذر چمن سردسیری که در تهران کشت می‌شود ترکیبی از دو یا سه گونه گراس چچم دائمی¹⁰ (3)، فتان قرمز¹¹ و پوا¹² می باشد. هدف از این تحقیق بررسی کارایی مدل‌های رگرسیون غیر خطی در پیش بینی سرعت جوانه زنی دو گونه چمن سردسیری چچم دائمی و فتان قرمز و دو گونه علف هرز غالب چمن، هفت بند و شیر تیغی و تعیین دماهای کاردینال آنها بود.

مواد و روش‌ها

واکنش جوانه زنی بذر دو گونه چمن فتان قرمزرقم ماکسیما و چچم دائمیرقم تایا و دو گونه علف هرز غالب آنها هفت بند و شیر تیغی (که از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع تهیه شده بودند) به دماهای 2، 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35، 40 و 45 درجه سانتیگراد در ژرمیناتور مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با 4 تکرار در آزمایشگاه اکولوژی مجتمع آزمایشگاهی رازی در دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات انجام شد. برای هر تکرار 25 عدد بذر انتخاب شدند که پس از ضد عفونی با هیپوکلرید سدیم 1 درصد به مدت 60 ثانیه درون پتری دیش‌هایی با قطر 9 سانتی متر حاوی کاغذ صافی و آتمن قرار گرفتند و با 10 میلی لیتر آب مقطر مرطوب شدند. پتری دیش‌ها در ژرمیناتور با تناوب نوری 16 ساعت روز و 8 ساعت شب و رطوبت نسبی 60 درصد قرار گرفتند. جهت حفظ رطوبت و تبادل حرارتی مناسب کاغذ صافی پتری دیش‌ها در طی آزمایش مرطوب نگه داشته شد. جهت شکستن خواب بذر هفت بند از سرمادهی مرطوب استفاده شد (8). شمارش بذور جوانه زده پس از گذشت 24 ساعت از شروع آزمایش هر روز انجام شد تا زمانی که تعداد تجمعی بذور جوانه زده به یک حد ثابت (14 روز) رسید. مبنای جوانه زنی بذور، خروج ریشه‌چه از پوسته بذر و رویت آن با چشم غیر مسلح بود (14). درصد و سرعت جوانه زنی در هر دما محاسبه شد. با شمارش بذور جوانه زده در هر روز متوسط زمان جوانه زنی برای بذور محاسبه شد. سپس سرعت جوانه زنی با استفاده از روش ماگیور (19) (معادله 1) محاسبه گردید (29).

$$Rs = \sum_{i=1}^n Si / Di \quad (1)$$

دما تاثیر مهمی بر خواب و جوانه زنی بذور دارد (16). دما مهمترین عاملی است که سرعت نمو علف‌های هرز (از جمله سرعت جوانه زنی) را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اثرات دما روی نمو گیاهان اساس مدل‌های مورد استفاده برای پیش بینی زمان جوانه زنی است (16). دامنه دمایی برای جوانه زنی توسط دماهای پایه، بهینه و بیشینه تعریف می‌شود. سرعت نمو بین دماهای پایه و بهینه افزایش می‌یابد، بین دماهای بهینه و بیشینه کاهش یافته و فراتر از دمای بیشینه و کمتر از دمای پایه متوقف می‌شود (22). انواعی از توابع ریاضی برای شرح رابطه بین سرعت جوانه زنی و دما استفاده شده است (22). توابع دمایی مختلفی برای توصیف واکنش جوانه زنی به دما وجود دارد که از میان آنها سه تابع دوتکه‌ای¹، بتا² و دندان مانند³ برای بررسی واکنش جوانه زنی بذرها به دما بیشتر از بقیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (2). امتیاز این توابع این است که پارامترهای این مدل‌ها دارای مفهوم بیولوژیکی مانند دماهای کاردینال، سرعت ذاتی جوانه زنی و سبز شدن هستند. استینماوس و همکاران (29) چندین روش مرسوم و جایگزین را برای تعیین دمای پایه جوانه زنی 9 گونه علف هرز مقایسه کردند. کامکار و همکاران (16) در مطالعه گیاه خشخاش⁴ با استفاده از مدل‌های رگرسیون غیرخطی مدل دوتکه‌ای را به عنوان مدل برتر در پیش‌بینی سرعت جوانه زنی معرفی کردند. آنها همچنین در مطالعه کمی سازی سرعت سبز شدن گندم در واکنش به دما با استفاده از مدل‌های رگرسیون غیرخطی مدل لجستیک را به عنوان مدل برتر انتخاب کردند. زینالی (34) با بررسی جوانه زنی در دامنه دمایی ثابت 5 تا 14 درجه سانتیگراد، دماهای کاردینال برای جوانه زنی 32 رقم گندم را به دست آوردند. کامکار و همکاران (15) و همکاران از مدل‌های دو تکه‌ای و لجستیک برای تعیین دماهای کاردینال جوانه زنی و سبز شدن گندم⁵ استفاده کردند. سلطانی (25) از مدل‌های بتا⁶، دو تکه‌ای و دندان مانند برای مدل‌سازی سبز شدن گیاه نخود⁷ در دماها و عمق‌های متفاوت استفاده کردند و مدل دندان مانند را به عنوان مدل برتر در پیش‌بینی سبز شدن این گیاه معرفی کردند. بنابراین، برخی از محققین از این مدل‌ها برای به دست آوردن دماهای کاردینال یعنی دمای پایه، دمای مطلوب و دمای بیشینه استفاده کرده‌اند (10، 11 و 13). خاوری و همکاران (18) نشان دادند که بین ارقام چمن از نظر واکنش به دماهای کاردینال تنوع وجود دارد، به طوری که دامنه این تنوع در دمای حداقل بین 4 تا

- 1- Intersected-lines Model
- 2- Five-Parameters Beta Model
- 3- Dent-like Model
- 4- *Papaver somniferum* L.
- 5- *Triticum aestivum* L.
- 6- Quadratic Polynomial Model
- 7- *Cicer arietinum* L.

- 8- *Polygonum aviculare* L.
- 9- *Sonchus oleraceus* L.
- 10- *Lolium perenne* TAYA
- 11- *Festucarubra* MAXIMA
- 12- *Poapratensis*

در هر 4 گونه مورد مطالعه در دماهای پایین با افزایش دما درصد جوانه زنی افزایش یافته اما در دماهای بالا کاهش یافته به گونه‌ای که در گونه‌های چچم دائمی، هفت بند و شیر تیغی در دمای 45 درجه سانتیگراد و در گونه فتان قرمز در 40 درجه سانتیگراد متوقف شد. بیشینه جوانه‌زنی بذر در چچم دائمی، فتان قرمز و شیر تیغی در دمای 15 درجه سانتیگراد و در هفت بند در دمای 20 درجه سانتیگراد به دست آمد (جدول 2). گزارشات متعددی حاکی از اثر افزایشی دما تا نقطه‌ای خاص بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور می‌باشد (6 و 30).

برای کمی سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی نسبت به دما از مدل‌های دو تکه‌ای (خطوط متقاطع) دندان مانند و چند جمله‌ای درجه دو استفاده گردید. مقادیر معیارهای مورد نظر برای مقایسه مدل‌های مختلف به منظور انتخاب مدل برتر برای توصیف سرعت جوانه‌زنی بذور مختلف نسبت به دما در جدول 3 ارائه شده‌اند. با توجه به این معیارها به منظور توصیف سرعت جوانه‌زنی نسبت به دما از مدل برتر برای هر گیاه جهت تعیین دمای کاردینال جوانه‌زنی استفاده گردید. بهترین مدل بخش بزرگتری از تغییرات را توجیه کرده و جذر میانگین مربعات خطا کوچکتری دارد (1 و 33).

با توجه به جدول 3 مدل خطوط متقاطع در گونه‌های چچم دائمی، فتان قرمز و شیر تیغی و مدل دندان مانند در هفت بند جذر میانگین مربعات خطا کوچکتری داشتند و بخش بزرگتری از تغییرات را توجیه کردند که نشان دهنده برتری این مدل‌ها در تخمین جوانه‌زنی این گونه‌ها بود. بنابراین مدل خطوط متقاطع در گونه‌های چچم دائمی، فتان قرمز و شیر تیغی و مدل دندان مانند در هفت بند بهترین برازش را داشتند (جدول 3). در مدل‌های خطوط متقاطع تغییرات سرعت نسبی نمو به طور جداگانه برای دماهای کمتر و بیشتر از دمای بهینه ترسیم می‌شود. دمای بهینه از محل تقاطع دو خط رگرسیونی محاسبه شده و دمای پایه و بیشینه به ترتیب عرض از مبدا خط رگرسیونی در دماهای کمتر و بیشتر از دمای بهینه می‌باشند (24). گزارش شده مدل خطوط متقاطع برای علف‌های هرز باریک برگ در دمای 3 تا 38 درجه سانتیگراد بهترین مدل برای تخمین دماهای کاردینال است (11). کارزونی منفرد و همکاران (17) از مدل خطوط متقاطع برای تخمین دماهای کاردینال تاج خروس⁴ استفاده کردند. در مطالعات انجام شده روی علف‌های هرز دیگر نتایج متفاوتی به دست آمده است. برخی محققان مدل‌های دندان مانند را برای پیش‌بینی جوانه‌زنی از مک⁵، جودره⁶ و جو موشی⁷ مناسب دانسته‌اند (12). واکنش سرعت نمو (شامل سرعت جوانه‌زنی) اکثر

RS: سرعت جوانه زنی (تعداد بذر در روز)، Si: تعداد بذر جوانه زده در هر شمارش و Di: تعداد بذر تا شمارش n ام

جهت تعیین دماهای کاردینال (پایه، مطلوب و بیشینه) از مدل‌های رگرسیون غیر خطی بین سرعت جوانه‌زنی و دماهای مختلف استفاده شد که در آنها دما به عنوان متغیر مستقل (محور X) و سرعت جوانه‌زنی به عنوان متغیر وابسته (محور Y) در نظر گرفته شده بود (10، 11 و 13).

مدل دو تکه‌ای (خطوط متقاطع) با استفاده از معادلات زیر (25)

$$f = \text{if}(T < T_0, \text{region 1 (T)}, \text{region 2 (T)}) \quad (2)$$

$$\text{Region 1 (T)} = b(T - T_b) \quad (3)$$

$$\text{Region 2 (T)} = c(T_m - T) \quad (4)$$

مدل دندان مانند با استفاده از معادلات زیر (32)

$$f(t) = \frac{(T - T_b)}{T_{o1} - T_b} \quad T_b < T \leq T_{o1} \quad (5)$$

$$f(t) = \frac{(T_c - T)}{(T_c - T_{o2})} \quad T_{o2} < T \leq T_c$$

$$F(t) = 1 \quad T_{o1} < T \leq T_{o2} \quad (6)$$

$$F(t) = 0 \quad T_c < T \text{ or } T \geq T_c$$

مدل چند جمله‌ای درجه 2¹ با استفاده از معادلات زیر

$$+ cT^2f = a + bT \quad (7)$$

$$T_0 = b + 2cT$$

تعیین گردیدند. در تمامی معادلات ذکر شده f: سرعت جوانه

زنی، T_0 ، T_b و T_m به ترتیب دماهای پایه، مطلوب و بیشینه و همچنین a و b به عنوان ضرایب رگرسیون در نظر گرفته شدند. برای اعتبار سنجی مدل از تحلیل نمودار باقیماندها² و ضریب تبیین³ (معادله 8) استفاده شد.

$$\frac{\sum(O_i - P_i)^2}{\sum(O_i - \bar{O})^2} R^2_{adj} = 1 - \quad (8)$$

که در این معادله O_i و P_i به ترتیب مقادیر اندازه گیری شده و پیش بینی شده و $\bar{O}$ میانگین مشاهدات می‌باشد. داده ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد انجام شد. برای تبدیل داده‌ها بر حسب درصد از $\arcsin\sqrt{x/100}$ و برای برازش مدل‌ها از نرم‌افزار Sigmaplot ver 11 استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس بیانگر آن است که درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در سطح یک درصد تحت تاثیر دما قرار گرفتند (جدول 1). این نتایج با نتایج سایر محققان همخوانی دارد (21 و 20).

4- *Amarabthus retroflexus* L.

5- *Cardaria draba* L.

6- *Hordeum spontaneum* Koch.

7- *H. murinum* L.

1- Quadratic Polynomial Model

2- Residuals Graph

3- R2 adjusted

نسبی نمو می‌گردد و سرانجام در دمای بیشینه سرعت نسبی نمو مجدداً به صفر می‌رسد و در دماهای بالاتر نیز صفر خواهد بود (27) و (26). چنانچه دماهای بهینه زیرین و زبرین به هم خیلی نزدیک یا برابر باشند تابع دندان مانند به صورت دو تکه‌ای در می‌آید. این نتایج نشان می‌دهد که قابلیت پیش بینی جوانه‌زنی و سبز شدن توسط مدل‌ها در گونه‌های مختلف، متفاوت است.

گیاهان به دما را می‌توان با استفاده از یک تابع دندان مانند توصیف کرد (27). بر اساس این تابع سرعت نسبی نمو در یک دمایی و کمتر از آن صفر می‌باشد. با افزایش دما از این مقدار سرعت نسبی نمو افزایش می‌یابد و در دمای زیرین بهینه به بیشینه می‌رسد. با افزایش بیشتر دما تا رسیدن به دمای بهینه زیرین سرعت نسبی نمو ثابت است. افزایش دما در فراتر از این حد مجدداً باعث کاهش سرعت

جدول 1- میانگین مربعات درصد و سرعت جوانه‌زنی چچم دائمی، فتان قرمز، هفت بند و شیرتیگی تحت تاثیر دماهای مختلف

Table 1-Mean squares of seedgermination percentage and germination rate of perenial rygrass, Fescue, Prostrate knotweed and Annual sowthistle under different tempratures

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	Mean of squares میانگین مربعات							
		Germination percentage درصد جوانه‌زنی				Germination rate سرعت جوانه‌زنی			
		چچم دائمی Perenial rygrass	فتان قرمز Fescue	هفت بند Prostrate knotweed	شیر تیگی Annual sowthistle	چچم دائمی Perenial rygrass	فتان قرمز Fescue	هفت بند Prostrate knotweed	شیر تیگی Annual sowthistle
دما	df	63869.62**	5476.27**	3106.48**	4519.85**	0.3217**	0.238**	0.1410**	0.1995**
Temperature									
خطا	9	12.291	2.63	12.0	6.008	0.0005	0.0513	0.0005	0.0002
Error									
C.V	30	7.64	4.08	14.02	7.71	7.55	6.54	13.26	7.19

** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد

** : Significant at %1 level of probability

جدول 2- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی چچم دائمی، فتان قرمز، هفت بند و شیرتیگی تحت تاثیر دماهای مختلف

Table 2-Mean comparison of seedgermination percentage of perenial rygrass, Fescue, Prostrate knotweed and Annual sowthistle under different tempratures

دما Temperature °C	درصد جوانه‌زنی Germination percentage			
	چچم دائمی Perenial rygrass,	فتان قرمز Red Fescue	هفت بند Prostrate knotweed	شیر تیگی Annual sowthistle
2	3.5	15.25	2.75	3.75
5	23.25	38.0	12.25	19.5
10	68.0	64.72	44.0	64.5
15	98.5	98.5	61.5	77.5
20	98.75	88.0	64.5	74.25
25	91.75	64.75	55.0	63.75
30	63.5	24.5	5.25	11.0
35	11.25	3.75	1.25	2.5
40	1.25	0	0.5	1.0
45	0	0	0	0
LSD	5.06	0.78	1.67	1.18

دائمی به ترتیب 4/12، 3/17 و 4/22 درجه سانتیگراد بود. دمای مطلوب برآورد شده در چچم دائمی توسط دو مدل خطوط متقاطع و چند جمله‌ای درجه 2 به ترتیب 26/66 و 24/22 درجه سانتیگراد و توسط مدل دندان مانند 25/60-25/14 درجه سانتیگراد بود. دمای بیشینه برآورد شده در چچم دائمی 43/27، 43/38 و 43/91 درجه

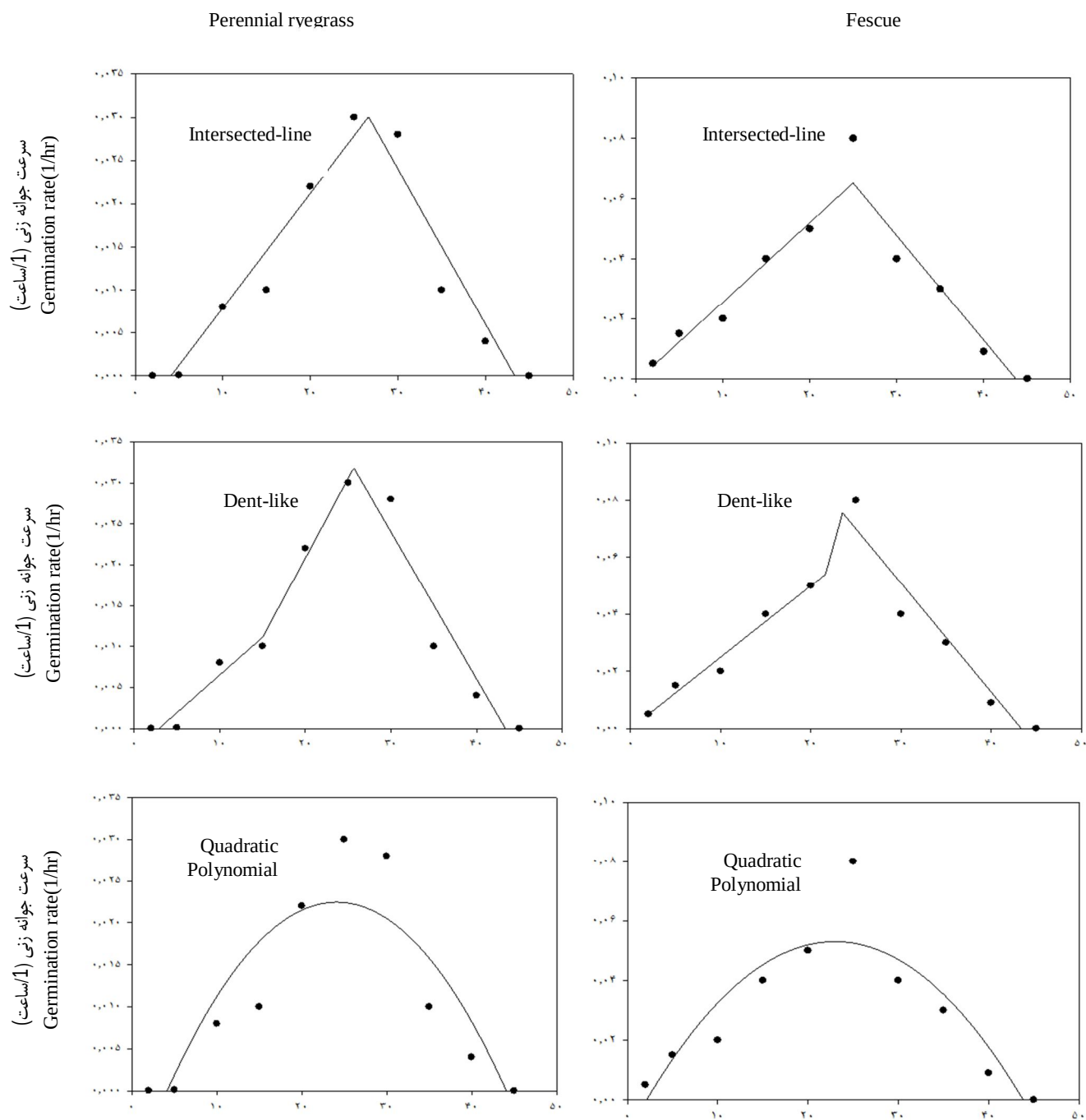
در جدول 3 مقادیر برآورد شده دماهای کاردینال توسط سه مدل در گونه‌های چچم دائمی، فتان قرمز، شیرتیگی و هفت بند آورده شده است. رابطه سرعت جوانه‌زنی و دما در گونه‌های مورد بررسی در شکل‌های 1 تا 4 نشان داده شده است. دمای پایه برآورد شده توسط مدل‌های خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه 2 در چچم

سانتیگراد توسط سه مدل خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه بود (جدول 3 و شکل 1). دمای مطلوب برآورد شده توسط مدل برتر در این تحقیق با یافته‌های شن و همکاران (23) مطابقت دارد. معادلات خط مدل‌های رگرسیونی در جدول 4 آورده شده است.

دماهای 2/، 2/31 و 2/11 درجه سانتیگراد به ترتیب دمای پایه برآورد شده توسط مدل‌های خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه 2 در فتن قرمز بودند (جدول 3). دمای مطلوب برآورد شده در فتن قرمز توسط دو مدل خطوط متقاطع و چند جمله‌ای درجه 24/86 و 22/85 درجه سانتیگراد و توسط مدل دندان مانند 23/49 تا 24/96 درجه سانتیگراد بود. دمای بیشینه برآورد شده توسط سه مدل خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه به ترتیب 43/17، 43/70 و 43/17 درجه سانتیگراد بود (شکل 2). با توجه به مدل برتر (خطوط متقاطع) دمای پایه فتن قرمز از چچم دائمی کمتر بود که نشان داد فتن قرمز زودتر از جیم دائمی، جوانه می‌زند. همچنین

Table3-Cardinal temperature based on three non-linear regression models

دما سانتی گراد Temperature	مدل خطوط متقاطع Intersected-lines Model				مدل دندان مانند Dent-like Model				چند جمله ای درجه 2 Quadratic Polynomial Model			
	چشم دائمی Pereni al ryegr ass	فتان قرمز Red Fesc ue	هفت بند Prostr ate knotwe ed	شیر تیغی Annual sowthis tle	چشم دائمی Pereni al ryegr ass	فتان قرمز Red Fesc ue	هفت بند Prostr ate knotwe ed	شیر تیغی Annual sowthis tle	چشم دائمی Pereni al ryegr ass	فتان قرمز Red Fesc ue	هفت بند Prostr ate knotwe ed	شیر تیغی Annual sowthis tle
پایه Base	4.12	2.0	2.85	2.0	3.17	2.31	2.95	3.05	4.22	2.11	2.23	2.0
مطلوب Optimum	26.66	24.86	19.95	17.77	-	-	-	-	24.22	22.85	22.08	22.21
مطلوب فوقانی	-	-	-	-	25.60	24.96	22.21	18.29	-	-	-	-
مطلوب تحتانی	-	-	-	-	25.14	23.49	19.94	18.05	-	-	-	-
بیشینه Maximum	43.27	44.48	42.85	44.86	43.38	43.17	44.97	40.41	43.91	43.70	42.68	42.11
R ² adjusted	0.89	0.89	0.87	0.94	0.88	0.86	0.90	0.95	0.70	0.72	0.67	0.75
جزر میانگین مربعات خطاء RMSE	0.003	0.008	0.0007	0.0005	0.003	0.008	0.0006	0.001	0.006	0.014	0.001	0.001



شکل 1- تاثیر دماهای مختلف بر سرعت جوانه زنی چچم دائمی و فتن قرمزبر اساس برازش سه مدل خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله ای درجه دوم

Figure 1- Predicted (lines) germination rate of Perennial ryegrass and Fescue at different constant temperatures using by Intersected-line, Dent-like and Quadratic Polynomial models

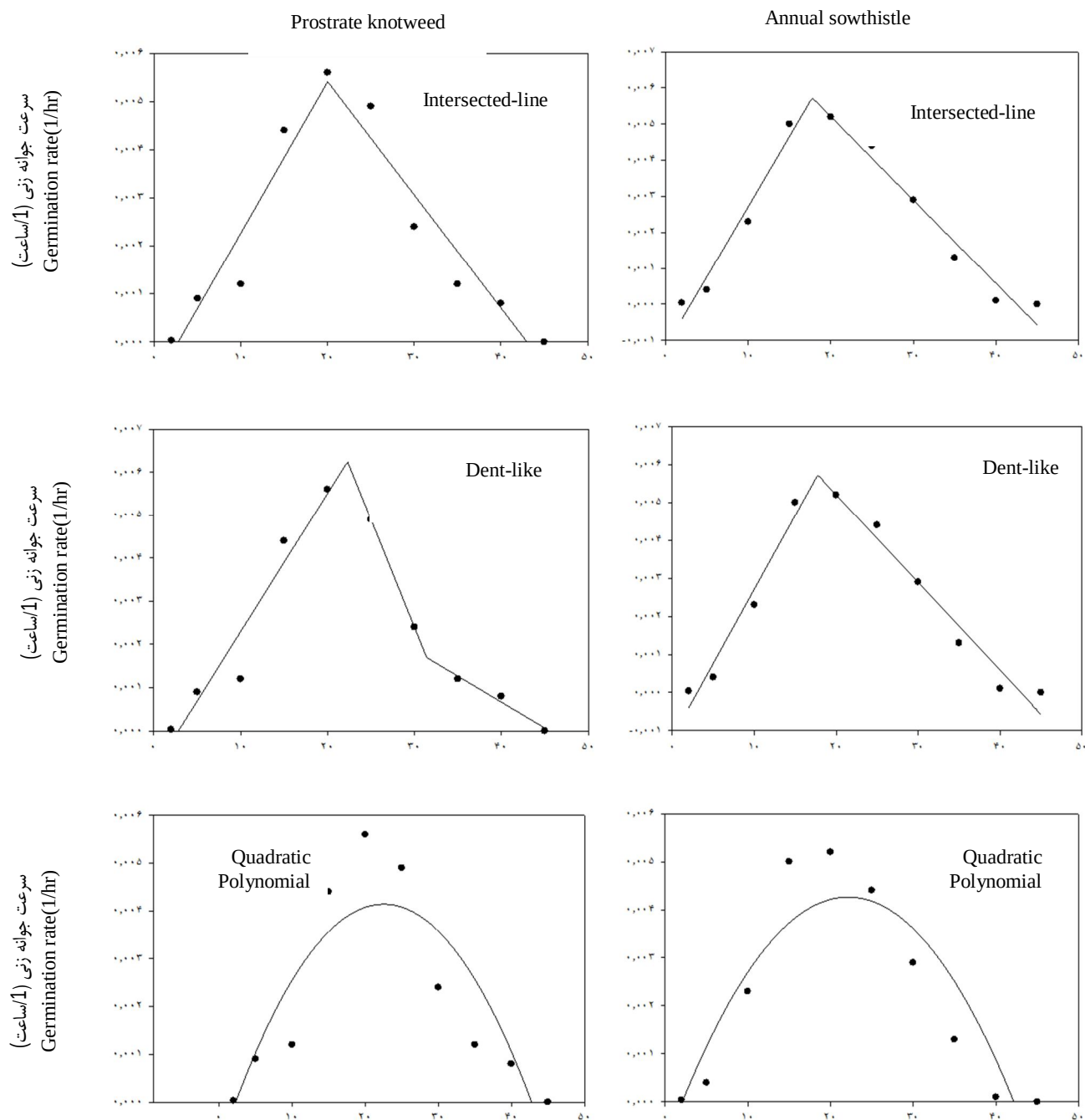
جدول 4 - معادلات خط مدل‌های رگرسیونی

Table 4- Equations of regression models

گونه Species	مدل Model		
	مدل خطوط متقاطع Intersected-lines Model	مدل دندان مانند Dent-like Model	چند جمله ای درجه Quadratic Polynomial 2 Model
چچم دائمی Perennial ryegrass	Region1 (t)= (-0.0028(26.6291-t)+0.0301(t-min t))/(26.6291- min t) Region2 (t)= (0.0301(max t-t)-0.003(t-26.62))/(max t-26.6291)	Region 1 (t)= (-0.0008(15-t)+0.0111(t-min t))/(15- min t) Region 2 (t)= (0.0111(25.6464-t)+0.318(t-15))/(25.6464-15) Region 3 (t)= (0.0318(max t-t)-0.003(t-25.6464))/(max t-25.6464)	$Y=-0.0103+0.0027x-0.00056329x^2$
فتان قرمز Red Fescue	Region1 (t)=(0.0042(25-t)+0.0652(t-min t))/(25-min t) Region2 (t)= (0.0652max t-t)-0.0047(t-25))/(max t-25)	Region1 (t)= (0.005(21.5971-t)+0.054(t-min t))/(21.5971-min t) Region 2 (t)=0.054(23.5134-t)+0.0757(t-21.5971))/(23.5134-21.5971) Region 3 (t)= (0.0757(max t-t)-0.0064(t-23.5134))/(max t-23.5134)	$Y=-0.0114+0.0056x-0.0001x^2$
هفت بند Prostrate knotweed	Region 1 (t)= (-0.0002(20-t)+0.0054(t-min t))/(20- min t) Region 2 (t)= 0.0054(max t-t)- 0.0005(t-20))/(max t -20)	Region 1 (t)= (-0.0003(22.3070-t)+ 0.0062(t-min t))/(22.3070- min t) Region 2 (t)= 0.0062(31.4035-t)+ 0.0017 (t-22.3070))/(31.4035-22.3070) Region3 (t)= 0.0017(max t-t)+0.0006666(t-31.4035))/(max t – 31.4035)	$Y=-0.001+0.0005x-0.00010103x^2$
شیر تیغی Annual sowthistle	Region 1 (t)= (-0.0004(17.7479-t)+0.0057(t-min t))/(17.7479- min t) Region 2 (t)= (0.0057 (max t-t)-0.0006(t-17.7479))/(max t-17.7479)	Region 1 (t)= (-0.0004(42.1874-t)+0.0059(t-min t))/(18.2184- min t) Region 2 (t)= 0.0059(42.1874-t)-0.0005(t-18.2184))/(42.1874-18.2184) Region 3 (t)= -0.0005(max t-t)+(0.0005228(t-42.1874))/(max t-42.1874)	$Y=-0.0009+0.0005x-0.00010601x^2$

(جدول 3 و شکل 2). مقادیر خطای باقیمانده سرعت جوانه زنی شیر تیغی و هفت بند در شکل 4 نشان داده شده است. در همه گونه‌های مورد بررسی سرعت جوانه‌زنی با افزایش دما بعد از دمای مطلوب کاهش یافت (شکل‌های 1 و 2). انعقاد پروتئین و اختلال در کار غشاها از جمله عواملی هستند که باعث کاهش سرعت جوانه زنی بذرها در دماهای بالاتر از دمای مطلوب می‌شوند (5). تیگرسون و همکاران (31) نیز کاهش کارایی متابولیکی بذرها را از دیگر عوامل کاهش سرعت جوانه‌زنی در دماهای بالاتر از دمای مطلوب گزارش کردند.

دمای پایه برآورد شده در شیر تیغی به ترتیب 2/، 3/05 و 2/0 درجه سانتیگراد توسط مدل‌های خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه 2 بود. دمای مطلوب توسط دو مدل خطوط متقاطع و چند جمله‌ای درجه 2 در شیر تیغی به ترتیب 17/77 و 22/21 درجه سانتیگراد برآورد شد و توسط مدل دندان مانند 18/05-18/29 درجه سانتیگراد بود بنابراین حداکثر جوانه‌زنی این علف هرز نسبت به دو گونه چمن مورد مطالعه در دمای پایین‌تری اتفاق می‌افتد. دماهای 40/41، 44/86 و 42/11 به ترتیب دماهای بیشینه برآورد شده توسط مدل‌های خطوط متقاطع، دندان مانند و چند جمله‌ای درجه 2 بودند



شکل 2- تاثیر دماهای مختلف بر سرعت جوانه زنی شیرتیغی و هفت بند بر اساس برازش سه مدل خطوط متقاطع، دندان مانند و چندجمله ای درجه دوم

Figure 2- Predicted (lines) germination rate of Prostrate knotweed and Annual sowthistle at different constant temperatures using by Intersected-line, Dent-like and Quadratic Polynomial models

نتیجه گیری کلی

چشم دائمی و فتان قرمز و علف های هرز هفت بند و شیر تیغی را پیش بینی نمود. در بین مدل های رگرسیون غیر خطی مدل خطوط متقاطع در گونه های چشم دائمی، فتان قرمز و شیر تیغی و مدل دندان مانند در گونه هفت بند به خوبی سرعت جوانه زنی را نسبت به

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از مدل های رگرسیون غیر خطی می توان جوانه زنی و سبز شدن دو گونه چمن سردسیری

این سه گونه در انواع چمن، متغیر است. نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که استفاده از چمن‌های اسپورتی که دارای نسبت بالاتری بذر گونه فتان قرمز می‌باشند موجب می‌شود چمن بتواند سریعتر از گونه‌های هفت بند و شیرتیغی مستقر شده و در رقابت پیروز باشد. هفت بند به صورت خوابیده رشد می‌کند که باعث می‌شود کنترل آن از طریق موور نیز غیر ممکن باشد. جهت مدیریت این دو علف هرز در چمن می‌توان از علف‌کش‌های پیش‌رویشی نیز استفاده کرد. موفقیت در استفاده از این علف‌کش‌ها نیازمند آگاهی داشتن از زمان جوانه‌زنی علف‌های هرز است. با استفاده از نتایج این تحقیق می‌توان کارایی مدیریت علف‌های هرز را در چمن بهبود بخشید.

دما توصیف نمودند و با توجه به کمترین جذر میانگین مربعات خطا و بیشترین ضریب تبیین بهترین برازش را برای جوانه‌زنی و سبز شدن بذور مورد بررسی نشان دادند. بنابراین از این مدل‌ها می‌توان در پیش‌بینی زمان جوانه‌زنی استفاده کرد. آگاهی داشتن از زمان جوانه‌زنی علف‌های هرز بسیار مهم است زیرا مرحله آغازین رقابت گیاه زراعی و علف هرز است. بررسی دماهای کاردینال نشان داد که گونه چمن فتان قرمز به علت پایین‌تر بودن دمای پایه نسبت به گونه چمن چچم دائمی و علف‌های هرز هفت بند و شیر تیغی زودتر جوانه می‌زند. چمن سردسیری کاشته شده در تهران چمن اسپورت است که ترکیبی از سه گونه چچم دائمی، فتان قرمز و پوا می‌باشد که نسبت

منابع

- 1- Ajam Norouzi H., Soltani A., Majidi E., and Homaei M. 2007. Modeling response of emergence to temperature in faba bean under field condition. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 14(4): 100-111.
- 2- Akram-Ghaderi F. 2008. The study of seed quality development, germination, longevity and deterioration in some medicinal plants: medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo. Convar. var. styriaca*), cumin blank (*Nigella sativa* L.) and borago (*Borago officinalis* L.). Ph.D. Thesis, Gorgan. Univer. Agric. Sci. Natur. Resour. 180p. (in Persian)
- 3- Amiri Nasab K., Ghasemnezhad M., Zakizadeh H. and Biglouei M.H. 2013. The Application of drought preconditioning is a method to increase deficit irrigation tolerance in two turfgrass species, tall Fescue (*Festuca arundinacea*) and creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(2):132- 138. (in Persian with English abstract)
- 4- Anderson R.L. and Nielsen D.C. 1996. Emergence pattern of five weeds in the Central Great Plains. *Weed Technology*, 10:744-749.
- 5- Balbaki R.Z., Zurayk R.A., Blek M.M., and Tahouk S.N. 1999. Germination and seedling development of drought tolerant and susceptible wheat under moisture stress. *Seed Science Technology*, 27: 291-302.
- 6- Bannayan M., Nadjafi F., Rastgoo M. and Tabrizi L. 2006. Germination properties of some wild medicinal plants from Iran. *Journal of Seed Technology*, 28: 80-86.
- 7- Barbosa O., Tratalos J.A., Armsworth P.R., Davies R.G., Fuller R.A., Johnson P., and Gaston, K.J. 2007. Who benefits from access to green space? A case study from Sheffield, UK Olga Barbosa. *Landscape and Urban Planning*, 83:187-195.
- 8- Baskin J.M., and Baskin C.C. 1990. The role of light and alternating temperatures on germination of *Polygonum aviculare* seeds exhumed on various dates. *Weed Research*, 30:397-402.
- 9- Buhler D.D., Liebman M., and Obrycki, J. J. 2000. Theoretical and practice challenges to an IPM approach to weed management. *Weed Science*, 48:274-280.
- 10- Garcia-huidobro J., Monteith J.L., and Squire G.R. 1982. Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum thyphoides* S. and H.) I. Constant temperature. *Journal of Experimental Botany*, 33: 288-296.
- 11- Hardegree S. 2006. Predicting germination response to temperature. I. Cardinal temperature models and subpopulationspecific regression. *Annals of Botany*, 97: 1115- 1125.
- 12- Hoseini M., Mojab M., and Zamani Gh. 2012. Evaluation wild barley (*Hordeum spontaneum* Koch.) barley grass (*H. murinum* L.) and hoary cress (*Cardaria draba* L.) germination in different temperatures. p. 108. In proceeding 4th Iranian Weed Science Congress, 6-7 February, 2004. Ahvaz, Iran.
- 13- Jame Y.W., and Cutforth H.W. 2004. Simulating the effects of temperature and seeding depth on germination and emergence of spring wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, 124: 207-218.
- 14- Jeffrey D.W., Timothym C.M., and John T.R. 1987. Solution volume and seed number: Often overlooked factors in allelopathic bioassays. *Journal of Chemical Ecology*, 13: 1424-1426.
- 15- Kamkar B., Ahmadi M., Soltani A., and Zeinali E. 2008. Evaluating non-linear regression models to describe response of wheat emergence rate to temperature. *Seed Science Technology*, 2: 53-57.
- 16- Kamkar B., Jami Al-Ahmadi M., and Mahdavi-Damghani A. 2011. Quantification of the cardinal temperatures and thermal time requirement of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) seeds germinate using non-linear regression models. *Indian Crop Production*, 35: 192-198.

- 17- Kazeruni monfared A., Rezvani Moghadam P., Nasiri Mahalati, M. and Tokasi S., 2012. Investigation on the cardinal temperatures for germination of *Solanum nigrum*. p. 122. In proceeding of 4th Iranian Weed Science Congress, 6-7 February. 2004, Ahvaz, Iran.
- 18- Khavari H., Goldani M., Khajehossaini M. and Shour M. 2016. Determination of Cardinal Temperatures and Germination Respond to Different Temperature for Five Lawns Cultivars. Journal of Horticultural Science, 30 :643-649 . (in Persian)
- 19- Maguire J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, 2: 176-177.
- 20- Nerson H. 2007. Seed production and germinability of cucurbit crops. Seed Science Biotechnology, 1: 1-10.
- 21- Page E.R., Gallagher R.S., Kemanian A.R., Zhang H., and Fuerst E.P. 2006. Modeling site-specific wild oat (*Avena fatua*) emergence across a variable landscape. Weed Science, 54:838-846.
- 22- Shafii B., and Price W.J. 2001. Estimation of cardinal temperatures in germination data analysis. Journal of Agriculture Biology Environment Statistics, 6: 356-366.
- 23- Shen J.B., Xu L.Y., Jin X.Q., Chen J.H. and Lu H.F. 2008. Effect of temperature regime on germination of seed of Perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Grass and Forage Science, 63:249-256.
- 24- Soltani A., Zeinali E., Galeshi S., and Latifi N. 2001. Genetic variation for and interrelationships among seed vigor traits in wheat from the caspian sea coast of Iran. Seed Science Technology, 29: 653-662.
- 25- Soltani A., Robertson M.J., Torabi B., Yousefi-Daz M., and Sarparast R. 2006. Modeling seedling emergence in chickpea as influenced by temperature and sowing depth. Agriculture Forest Meteorology, 138: 156-167.
- 26- Soltani E., Akram-Ghaderi F., and Soltani A. 2008a. Applications of germination modeling on the response to temperature and water potential in seed Science Research. 1st National Conference of Seed Sciences and Technology in Iran. Gorgan, Iran. 445p.
- 27- Soltani A., Ghaderi-Far F., and Soltani E. 2008b. Application of germination in response to temperature and water potential in seed Science Research the 1st National Conference Sciences and Technology of seeds. 12-13 November. 2008. Gorgan, Iran,
- 28- Soltani A., and Maddah V. 2010. Simple Applied Programs for Education and research in Agronomy. Issa Press, Iran. 80p.
- 29- Steinmaus S.J., Prather T.S., and Holt J.S. 2000. Estimation of base temperature for nine weed species. Journal of Experimental Botany, 51: 275-286.
- 30- Tabrizi L., Nasiri Mahallati M., and Koocheki A. 2004. Investigation on the cardinal temperature for germination on *Plantago ovata* and *Plantago psyllium*. Journal of Iranian Field Crops Research. 2: 143-150.
- 31- Thygeson T., Harris, J.M., Smith B.N., Hansen L.D., Pendleton R.L., and Booth D.T. 2002. Metabolic response to temperature for six populations of winter fat (*Eurotia lanata*). Thermochimica Acta, 394: 211-217.
- 32- Torabi B., 2004. Prediction of physiological development stages in chickpea. MS.c. Thesis. Gorgan University, Gorgan, Iran.
- 33- Yousefi-Daz M., Soltani A., ghaderi-far F., and Sarparast R., 2006. Evaluation of non-linear regression models to describe response of emergence rate to temperature in chickpea. Agriculture. Science and Technology, 20: 93-102.
- 34- Zeinali E., Soltani A., Galeshi S., and Sadati S.J. 2010. Cardinal temperatures, response to temperature and range of thermal tolerance for seed germination in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Journal of Plant Production, 3(3): 23-42.



Determination of Cardinal Temperatures for Cool Season Turfgrass and Two Common Weed Species

M. Diyanat^{1*}

Received: 23-11-2016

Accepted: 06-09-2017

Introduction: The presence of broadleaf weeds not only reduces the aesthetic quality of the turfgrass, but more importantly they compete with desired turfgrass for water, nutrients, and light. Weed management after seeding is an important component to successfully establishing a healthy stand of cool season turfgrass. Weed seed germination is a key process because determines both the number of weeds that could potentially emerge and the timing of their appearance in the turfgrass. Temperature is of the most important factor regulating germination of non-dormant seeds in irrigated, annual agroecosystems at the beginning of the growth season where light, nutrients, and moisture are typically not growth limiting. Also prostrate knotweed (*Polygonum aviculare* L.) and annual sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.) are two annual common broad leaf weeds in cool season turfgrass. Prostrate knotweed is very competitive in infertile and compacted soils and often invades turfgrasses along driveways, sidewalks, and beaten paths across lawns. Annual sowthistle is found in open habitats that include waste areas, turf, and roadsides. The aim of this study was to evaluate different nonlinear regression models to describe response of germination rate to different temperatures in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), fescue (*Festuca rubra* L.), prostrate knotweed and annual sowthistle.

Materials and Methods: This experiment was based on completely randomized design with 4 replications at Islamic Azad University in the laboratory of Science Research Branch in 2015. The seeds were treated with different temperatures (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45°C). Twenty five seeds were placed in each petri dish for each species in per replication. Ten milliliters of distilled water were added to each petri dish and the filter papers were regularly moistened to ensure saturation throughout the germination tests. Petri dishes were placed in germinator with 16 hour day, 8 hour night and 60% relative humidity. Seeds were considered germinated when the radicle protruded at least 2 mm from the seed coat. Germinated and rotted seeds were counted and discarded at 24 hour intervals until no germination had occurred over four consecutive days. The germination percentage was obtained by dividing the number of germinated seeds at any time by the total number of seeds germinated multiplied by 100. Data from this experiment were first subjected to analysis of variance and means of treatments were compared using the least significant difference at the 5% level of probability. The following nonlinear regression models were used to quantify the response of the germination rate to temperature and to determine cardinal temperatures.

Results and Discussion: The analysis of variance showed that temperature had a significant effect on all seed germination percentage and germination rates. Seed germination percentage and rate increased to a point with increasing the temperature. Germination model based on temperature can be used for the prediction of cardinal temperatures. Cardinal temperatures are required because a portion of the crop model is developed for prediction of the timing of germination. Non-linear regression models have been used to quantitatively describe development rate in many plants. Three regression models (Intersected-lines, Dent-like and Quadratic Polynomial) used to predict germination rate and cardinal temperature. Root mean square of error (RMSE) and R^2 adjusted were used to find the appropriate model(s). Intersected-lines model was superior compared to other models in perennial ryegrass, fescue and annual sowthistle and Dent-like model was superior for prostrate knotweed. It was concluded that this model can be used to quantify response of turfgrass and common weeds of turfgrass germination to temperature and to obtain cardinal temperature of germination. Also base, optimum and maximum temperatures were for perennial ryegrass 4.12, 24.66 and 43.27°C; fescue 2.0, 24.86 and 43.48°C; Prostrate knotweed 2.95, 19.94-22.21 and 44.97°C and annual sowthistle 2.0, 17.77 and 44.86°C, respectively.

Conclusions: These results show that fescue germinated earliest among the studied species, because it had the lowest base temperature. In comparison to perennial ryegrass, using turfgrass seed with more fescue seed causes sooner turfgrass establishment and less weed competition. Because of their narrow leaves, young

1- Assistant Professor, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

(* - Corresponding Author Email: mdianat@ut.ac.ir)

seedlings of prostrate knotweed grow upright and appear at first glance to be grass seedlings. With maturity, most plants grow prostrate, especially with traffic or mowing, so mechanical control of this species in turfgrass is impossible and it could be controlled with pre-emergence herbicide. Pre-emergence herbicides are applied prior to the germination of weeds; thus, predication of timing germination help us in decreasing prostrate knotweed competition with turfgrass and its proper management.

Keywords: Fescue, Germination rate, Perennial ryegrass, Regression models, Seed germination percentage



بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی در باغات تجاری مشهد با نشانگر ISSR

شادی عطار¹ - غلامحسین داوری‌نژاد^{2*} - لیلا سمیعی³ - محمد مقدم⁴

تاریخ دریافت: 1395/10/05

تاریخ پذیرش: 1396/05/14

چکیده:

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) موجود در باغ‌های استان خراسان رضوی از نشانگر مولکولی ISSR استفاده گردید. با این هدف 56 ژنوتیپ گردو از باغ‌های استقلال، گلستان، اندشت و امام رضا انتخاب، پلاک‌کوبی و مورد آزمایش واقع شدند. با استفاده از 9 آغازگر مورد استفاده، در مجموع 118 باند تولید شد که در محدوده 300 تا 3000 جفت باز بود و 29 باند چند شکل بودند. تعداد قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر متفاوت بود، به طوری که آغازگر 844 تعداد 14 عدد و آغازگر 890 تعداد 8 عدد باند تکثیر شده داشت. متوسط قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر 9/83 بود. در دندوگرام حاصل از خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA 10 کلاستر تشکیل شد. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه پایین بود که دلایل عمده آن دخالت‌های انسانی، انتخاب و تکثیر تعداد معدودی از ژنوتیپ‌های برتر و گاها خود کرده افشانی گردو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ارقام بومی، آغازگر، تشابه، جفت باز، کلاستر

مقدمه

روی محصولات باغی به خصوص درخت گردو انجام نشده است. بنابراین می‌توان با شناسایی خصوصیات ژنوتیپ‌ها و ارقام مختلف، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز محققان اصلاح و به‌نژادی را در دسترس آن‌ها قرار داد. همچنین با بررسی خزانه ژنی موجود در منطقه اقدام به انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم، سازگار، پر محصول و با کیفیت میوه (ژنوتیپ‌های برتر) در شرایط آب و هوایی مورد آزمایش نمود و آن‌ها را برای تکثیر و احداث باغ‌های جدید در اختیار باغداران قرار داد.

نشانگرهای مولکولی قسمت‌هایی از DNA هستند که در ژن‌های اصلی بر روی کروموزوم قرار گرفته و همراه با آن‌ها به نسل بعد انتقال می‌یابند. نشانگرهای بین ریز ماهواره‌ای یا ISSR³ اولین بار در سال 1994 شناسایی شدند. علی‌رغم سابقه نه چندان طولانی آن‌ها، به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان همچون تکرار پذیری بالا، پراکندگی یکنواخت در سطح ژنوم، قدرت تفکیک بالا و سرعت و سهولت اجرا به طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک گیاهی به کار گرفته شده‌اند (14 و 24).

روشهای مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و توده‌های گردوی اروپایی و آسیایی و شناسایی ارقام تجاری گردو استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی شاخص‌های مورفولوژیک (9 و 16)، آلوزایم (6)، ایزوزایم (7)، نشانگر RFLP (1)، نشانگر RAPD (15)، نشانگر AFLP (2) و

گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) متعلق به خانواده ژوگلانداسه² در عرض جغرافیایی 29 تا 39 درجه شمالی و طول جغرافیایی 45 تا 64 درجه شرقی و در مناطق شمال، غرب و مرکز کشور ایران بیشترین گسترش را دارد. منشأ طبیعی گردو، مناطق کوهستانی آسیای مرکزی و به ویژه جنگل‌های شمال ایران است. اکثر ژنوتیپ‌های موجود گردو بذری بوده و به روش جنسی تکثیر می‌شوند. بررسی ساختار ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها جهت شناسایی، انتخاب و نگهداری ذخایر ژنی آنها حائز اهمیت می‌باشد (21).

شناسایی و جمع‌آوری ارقام بومی درختان میوه اولین گام در مسیر برنامه‌های اصلاحی به شمار می‌آید و عدم اطلاع متخصصان اصلاح از خصوصیات ژنتیکی گیاهان موجب می‌شود که کار به نژادی با کندی صورت گیرد. در کشور ما به دلیل نبود شناخت در مورد ژن‌های مطلوب و ژرم‌پلاسما گیاهی برنامه‌های اصلاحی در خور توجهی بر

1، 2 و 4- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*) - نویسنده مسئول: Email: Davarynej@um.ac.ir
3- استادیار گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

نشانگر ISSR (19) اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و استخراج DNA ژنومی از برگ:

در این پژوهش 56 ژنوتیپ گردو طی سال‌های 1392 تا 1394 در چهار باغ منتخب استان خراسان رضوی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای شروع طرح 42 درخت گردو در باغ استقلال (باغ شماره 1) واقع در روستای شلنگرد متعلق به بنیاد مستضعفان، 8 درخت در باغ گلستان (باغ شماره 2) واقع در 35 کیلومتری جاده مشهد چناران متعلق به شرکت شهید ایران، 3 درخت در باغ اندشت (باغ شماره 3) واقع در بلوار کوهسنگی و 3 درخت در باغ امام رضا (باغ شماره 4) واقع در بلوار توس که هر دو باغ متعلق به سازمان باغات استان قدس رضوی هستند، به طور کاملاً تصادفی انتخاب و پلاک‌کوبی شدند (جدول 1). در بهار 92 با شروع رشد درختان و باز شدن برگ‌ها اقدام به جمع‌آوری برگ‌های هر یک از ژنوتیپ‌ها شد. از هر ژنوتیپ حدود 200 میلی گرم برگ توزین شد و در فویل آلومینیومی بسته‌بندی شده و در فریزر -80 درجه سانتیگراد قرار داده شد. استخراج DNA با روش دوپیل اند دوپیل (5) انجام شد.

پس از استخراج DNA کیفیت نمونه‌ها توسط ژل آگارز 1 درصد و استفاده از روش الکتروفورز و کمیت آنها توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موجهای 260 و 280 نانومتر تعیین شد.

تکثیر ریزماهورها و واکنش PCR

در ابتدا برای انجام این پژوهش 24 آغازگر نشانگر ISSR تهیه و پس از ارزیابی اولیه آنها بر روی 5 ژنوتیپ که به صورت تصادفی از میان ژنوتیپ‌ها جدا شده بودند 9 پرایمر با چندشکلی و تکرار پذیری بالا جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند، که مشخصات آنها در جدول 2 آمده است.

برای انجام واکنش PCR از کیت امپلیکون (کد 180301، ساخت کشور دانمارک) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ده میکرولیتر و با استفاده از 5 میکرولیتر کیت، 2 میکرولیتر DNA رقیق شده (که غلظت باید بین 10 تا 15 نانوگرم باشد)، 2/7 میکرولیتر آب استریل و 0/3 میکرولیتر پرایمر (غلظت 10 پیکومول) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر با واسرشت سازی اولیه DNA ژنومی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه آغاز و با 35 چرخه شامل دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 25 ثانیه برای واسرشت سازی، اتصال پرایمرها به رشته الگو به مدت 25 ثانیه بسته به دمای پرایمر (دمای پرایمر از 47/6 تا 53/9 درجه سانتیگراد متغیر بود)، بسط رشته جدید به مدت 1 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد و گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد دنبال شد.

جی و همکاران (11) با بررسی تنوع ژنتیکی چند جمعیت گردو در شمال چین با نشانگر ISSR نشان دادند که جمعیت‌ها در تجزیه خوشه‌ای UPGMA در 8 خوشه و سه گروه قرار گرفتند. تیان و همکاران (20) با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بذری گردو با نشانگر ISSR در چهار منطقه چین آنها را به 5 شاخه تقسیم نمودند. جیا و همکاران (10) حدود 77 ژنوتیپ پکان (گردو گرمسیری) را با 77 آغازگر ISSR و 19 آغازگر SSR ارزیابی کردند و 94 باند تکثیر شده بین 140 تا 1950 bp را برای نشانگر ISSR مشاهده کردند. کریستوپولوس و همکاران (3) با استفاده از نشانگر مولکولی ریز ماهورها به بررسی تنوع ژرم‌پلاسما و ارتباط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو بومی یونان و ارقام خارجی گردو پرداختند و مشاهده کردند که ارقام خارجی در یک گروه قرار می‌گیرند؛ اما ژنوتیپ‌های بومی در یک گروه مجزا قرار نگرفتند. پولیگیونی و همکاران (18) با استفاده از نشانگرهای SSR، ISSR، RAPD ژنوتیپ‌های بذری و هیبریدهای بین گونه‌ای را در بین گونه گردوی سیاه و گردوی ایرانی تفکیک نمودند؛ تجزیه‌های سیتولوژیکی نشان داد که حالت تریپلوئیدی نیز در گونه‌های فوق مشاهده می‌شود. پوتر و همکاران (19) 48 ژنوتیپ گردو را در ایالت کالیفرنیا با 47 آغازگر ISSR مطالعه کردند و مشاهده کردند که 15 تا از ژنوتیپ‌ها فقط با یک آغازگر از سایرین مشخص می‌شوند. 31 ژنوتیپ با حداقل 2 آغازگر و 2 تای باقیمانده به 3 آغازگر برای تشخیص نیاز داشتند. فورونی و همکاران (8) از نشانگرهای ریزماهورها برای شناسایی گردوی ایرانی و ارزیابی همبستگی ژنتیکی بین ارقام و بیوتیپ گردوی سورنتو استفاده کردند. در این مطالعه با استفاده از 23 جفت نشانگر ریزماهورها 10 دانهال سورنتو و 6 هم‌گروه پیوندی سورنتو با 6 رقم گردو مورد مقایسه قرار گرفتند و در 6 جفت از 23 جفت آغازگر مورد مطالعه 33 آل را شناسایی کردند.

محمودی و همکاران (12) با بررسی تنوع تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو ایرانی با نشانگر ISSR اشاره داشتند که این نشانگر جمعا 103 قطعه تولید نمود که 93 تای آن چند شکل بودند.

با توجه به اینکه گردو یک گیاه دگرگشن بوده و روش تکثیر عمده آن کشت بذر می‌باشد، بنابراین تصور می‌شود که تنوع ژنتیکی بسیار بالایی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شود و با توجه به اینکه تا کنون گزارش مدونی در مورد تنوع ژنتیکی گردو خصوصا با استفاده از نشانگرهای مولکولی در سطح استان خراسان رضوی انجام نشده است بهتر است مورد در باغ‌های گردو استان خراسان هم کنترل شود، لذا هدف از انجام پژوهش حاضر ارزیابی کارایی نشانگر ISSR برای مطالعات تنوع ژنتیکی گردو ایرانی و ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی موجود در تعدادی از باغ‌های استان خراسان رضوی می‌باشد.

تفکیک محصولات واکنش PCR با بارگذاری آنها بر روی ژل آگارز 2 درصد حاوی TBE 0/5 X در دستگاه الکتروفورز انجام شد. بعد از سپری شدن زمان لازم (اختلاف پتانسیل 85 ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز) از ژل‌ها توسط دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

جدول 1- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گردو و محل جمع آوری آنها

Table 1- The studied genotype and collection places

ژنوتیپ Genotype	محل جمع‌آوری Place	ژنوتیپ Genotype	محل جمع‌آوری Place
Es 6	باغ استقلال - شرکت زراعت و باغداری مشهد باغ شماره 1 Esteghlal orchard. No 1	Es 37	باغ استقلال - شرکت زراعت و باغداری مشهد باغ شماره 1 Esteghlal orchard. No 1
Es 7		Es 38	
Es 8		Es 39	
Es 9		Es 40	
Es 10		Es 41	
Es 11		Es 42	
Es 12		Es 43	
Es 13		Es 44	
Es 14		Es 45	
Es 15		Es 46	
Es 16		Es 47	
Es 17		Es 48	
Es 18		Es 49	
Es 20		Es 50	
Es 21		G 51	
Es 22		G 53	
Es 23		G 55	
Es 24		G 56	
Es 25		G 57	
Es 26		G 58	
Es 27		G 59	
Es 28	باغ گلستان - شرکت شهدایران باغ شماره 2 Golestan orchard No 2	G 60	
Es 29		A 64	باغ الندشت - سازمان باغات آستان قدس رضوی باغ شماره 3 Alandasht orchard No 3
Es 32		A 65	
Es 33		A 66	باغ امام رضا - سازمان باغات آستان قدس رضوی باغ شماره 4 Emam Reza orchard No 4
Es 34		E 67	
Es 35		E 68	
Es 36		E 70	

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تصویر ژل‌های الکتروفورز حاصل از آغازگرهایی که باندهای چندشکل با وضوح مناسب تولید کرده بودند به صورت دستی تجزیه شد. سپس به حضور یا عدم حضور یک باند در هر نمونه، با استفاده از اعداد صفر و یک امتیازدهی و در نهایت با استفاده از نرم افزار NTedit به ماتریس تبدیل شد. شباهت ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار NTSyspc. روش SIMQUAL و ضریب تشابه DICE محاسبه شد. دندوگرام با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ترسیم گردید. تجزیه به مختصات اصلی (PCO) با استفاده از نرم افزار NTSys انجام شد و گروه‌بندی نمونه‌ها در پلات دو بعدی بررسی شد.

برای هر نشانگر در این آزمایش محتوی اطلاعات چند شکلی

(PIC) با استفاده از رابطه زیر به دست آمد، که f_i فراوانی نسبی آلل تکثیر شده و $1-f_i$ فراوانی نسبی آلل‌های تکثیر نشده است.

$$PIC = 2f_i(1-f_i)$$

هتروزایگوسیتی متوسط هر پرایمر (H_{av}) از رابطه زیر محاسبه شد که در آن f_i فراوانی نسبی آلل تکثیر شده و $1-f_i$ فراوانی نسبی آلل‌های تکثیر نشده و N تعداد مکان‌های ژنی یا لوکوس هر آغازگر است.

$$H_{av} = \sum [2f_i(1-f_i)]/N$$

شاخص نشانگر (MI) با استفاده از معادله زیر بدست آمد، که EMR نسبت چندگانه موثر بوده و بیانگر تعداد کل مکان‌های ژنی چند شکل هر آغازگر است، و در رابطه نسبت چندگانه موثر np تعداد مکان‌های چندشکل و n تعداد کل مکان‌های ژنی هر آغازگر میباشد.

$$MI = H_{av} \times EMR$$

که I_b میزان آگاهی بخش بودن هر باند یک پرایمر است که از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$I_b = 1 - (2 \times [0/5 - p])$$

$EMR = np (np/n)$
 قدرت تفکیک (R_p) آغازگر بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌ها می‌باشد از فرمول زیر بدست می‌آید:
 $R_p = \sum I_b$

جدول 2- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی مورد مطالعه

Table 2- Specifications of ISSR primers in study of persian walnut Genotypes

نام آغازگر Primer	توالی Sequence	دمای اتصال بهینه (درجه سانتیگراد) Annaling temperature (c)
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	48.5
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	52.4
UBC 830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	51
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	53.9
UBC 844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	52.4
UBC 873	-AGA CAG ACA GAC A	48.2
UBC 890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	47.6
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	47.6

نتایج و بحث

برای تعیین مقدار تنوع و فرسایش ژنتیکی در نظر گرفته شود. درصد چند شکلی را پولیگونی و همکاران (17) 62/5 درصد در ارقام مورد مطالعه ایتالیا و دوگان و همکاران (4) برای ارقام مورد مطالعه ترکیه 69/05 گزارش کردند.

علاوه بر تعداد آل‌های شناسایی شده و درصد چند شکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) هر آغازگر نیز محاسبه شد که نتایج آن در جدول 3 آمده است. بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر UBC830 برابر 0/45 و کمترین آن مربوط به آغازگر UBC844 معادل 0/08 بود.

میزان PIC یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. از این جهت نشانگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند. بنابراین می‌توان آغازگر UBC830 را برای مطالعات بعدی به عنوان مناسب‌ترین آغازگر ISSR در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گردو پیشنهاد کرد. میزان PIC را کریستوپلوس و همکاران (3) بین 0/035 تا 0/499 ثبت کردند.

بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به آغازگر UBC830 (3/6) و کمترین مربوط به آغازگر UBC834 (0/03) به دست آمد. کریستوپلوس و همکاران (3) آغازگر UBC814 را در مطالعاتشان به عنوان آغازگری با بیشترین شاخص نشانگر معرفی کردند. توانایی آغازگر جهت متمایز کردن تعداد زیادی از ژنوتیپها با قدرت تفکیک نشان داده می‌شود. بیشترین قدرت تفکیک 3/89 در آغازگر

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی در باغ‌های منتخب استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا برای انجام این پژوهش، تعداد 24 پرایمر مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از ارزیابی اولیه آنها بر روی 5 ژنوتیپ که به صورت تصادفی از میان ژنوتیپ‌ها انتخاب شده بودند 9 پرایمر با چندشکلی و تکرار پذیری نسبتاً بالا جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی در جدول 3 آمده است. در مجموع پرایمرها 118 باند قابل امتیازدهی تولید کردند که در محدوده 300 تا 3000 جفت باز بود. تیان و همکاران (20) با استفاده از 9 آغازگر ISSR 101 باند و دوگان و همکاران (4) با استفاده از 25 آغازگر ISSR 211 باند مشاهده کردند. محدوده سائز باندها در مطالعه جی و همکاران (11) 300 تا 1200 جفت باز، کریستوپلوس و همکاران (3) 200 تا 1480 بود. تعداد قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر متفاوت بود به طوری که آغازگر UBC844 تعداد 14 عدد و آغازگر UBC890 تعداد 8 عدد باند تکثیر شده داشت، متوسط قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر 9/83 بود. جی و همکاران (11) ضریب تکثیر متوسط آغازگرهای ISSR را 10/11، دوگان و همکاران (4) 8/44، کریستوپلوس و همکاران (3) 13/3 و پولیگونی و همکاران (17) 12/8 گزارش کردند.

درصد چند شکلی در آغازگرهای مختلف متفاوت بود. حداکثر چند شکلی ایجاد شده (80 درصد) مربوط به پرایمر UBC830 بود. به طور کلی، با توجه به اینکه درصد باندهای چندشکل سازگاری پایینی نسبت به هر تغییر محیطی نشان می‌دهد، می‌تواند به عنوان شاخصی

UBC830 و کمترین قدرت تفکیک مربوط به UBC834 (0/32) دهد هر آغازگر چه تعدادی از ژنوتیپ‌ها را می‌تواند شناسایی کند. مشاهده شد (جدول 3)، قدرت تفکیک شاخصی است که نشان می‌-

جدول 3- دامنه اندازه مولکولی آلل‌ها، تعداد قطعات تولید شده، درصد و محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرهای ISSR منتخب
Table 3- Range of molecular size, number of fragments, percentage and content of polymorphism of ISSR primers

نام آغازگر Primer	قدرت تفکیک (RP)	شاخص نشانگر (MI)	نسبت چندگانه موثر (EMR)	میانگین هتروزیگوسیتی (HAV)	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	تعداد پلی مورفیسیم	تعداد قطعات چند شکل	تعداد کل قطعات تکثیر شده	دامنه اندازه باند های مشاهده شده
UBC 825	2.28	0.60	4	0.15	0.35	66.66	6	9	550 - 2500
UBC 827	2.35	0.41	2.5	0.16	0.32	50	5	10	400-2800
UBC 830	3.89	1.64	6.4	0.25	0.45	80	8	10	650-3000
UBC 834	0.32	0.002	0.09	0.02	0.03	9.09	1	11	450-2400
UBC 842	0.64	0.01	0.36	0.02	0.18	18.18	2	11	350-2200
UBC 844	0.78	0.002	0.07	0.03	0.08	7.14	1	14	300-2500
UBC 873	0.75	0.02	0.4	0.05	0.27	20	2	10	400-2700
UBC 890	1.07	0.04	0.5	0.08	0.37	37.5	3	8	450 - 2200
UBC 891	1.17	0.02	0.4	0.07	0.12	20	2	10	450-1800
کل Total							29	118	
میانگین Average						25.71	2.41	9.83	

در گروه هشتم دوژنوتیپ متعلق به باغ شماره 2 جای گرفتند. در گروه نهم جمعا 20 ژنوتیپ قرار داشتند که 9 ژنوتیپ باغ شماره 1 در زیر گروه‌های مجزا قرار گرفتند، دو ژنوتیپ باغ شماره 1 با یک ژنوتیپ از باغ شماره 3 در یک زیر گروه، دو ژنوتیپ باغ شماره 1 با یک ژنوتیپ از باغ شماره 2 در یک زیر گروه و دو ژنوتیپ باغ شماره 3 با 3 ژنوتیپ باغ شماره 2 در یک زیر گروه مجزا جای گرفتند. در گروه دهم دوژنوتیپ باغ شماره 3 قرار گرفتند.

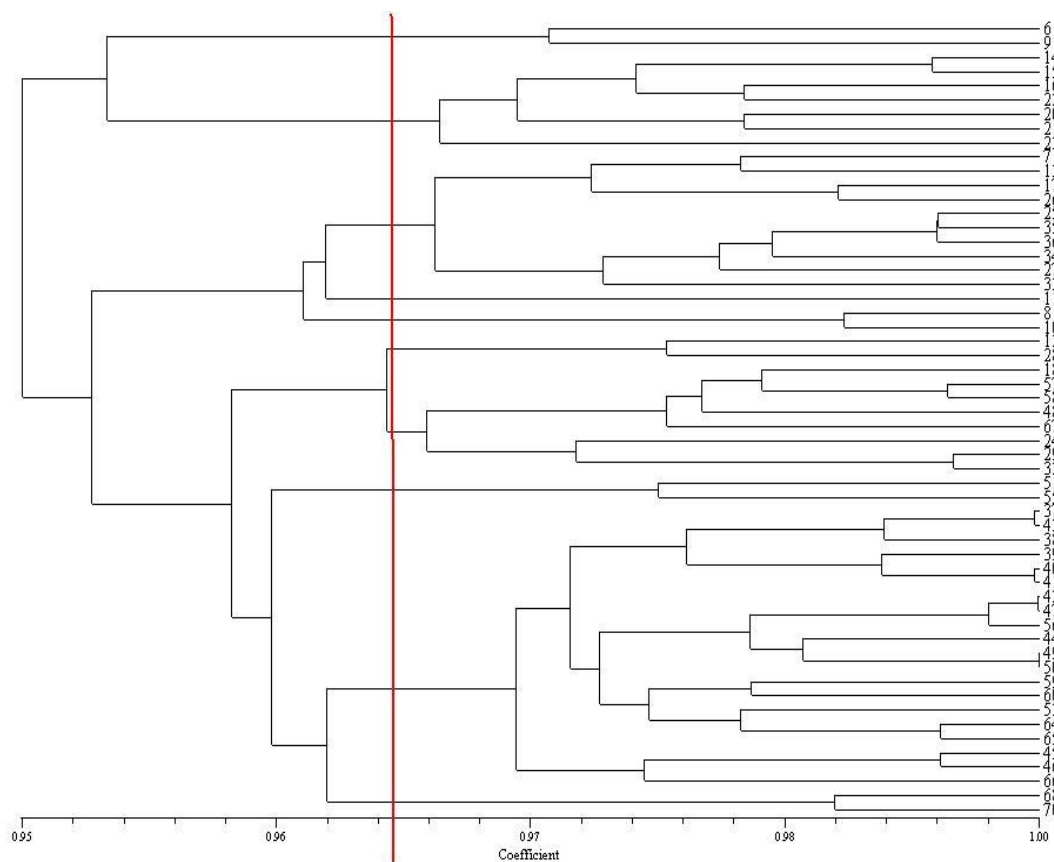
مارکر مولکولی ISSR تا حدودی توانست وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گردو را آشکار کند و ژنوتیپ‌ها را بر اساس محل باغ از یکدیگر تفکیک کند.

نمودار مربوط به تجزیه مولفه‌ها نیز در شکل 2 رسم شده است، که نتایج مربوط به این تجزیه تحلیل تا حد زیادی نتایج مربوط به تجزیه خوشه‌ای را تایید می‌کند و بیشتر ژنوتیپ‌هایی که در دندوگرام در یک گروه قرار داشتند در PCO نیز کنار هم قرار گرفتند که این خود تاییدی بر نتایج به دست آمده است.

برای تعیین همبستگی بین ماتریس حاصل از دندوگرام و ماتریس تشابه دایس ضریب همبستگی کوفنیک محاسبه شد که مقدار آن برابر با 0/699 و میزان t منتل 15/67 بود که نشان دهنده همبستگی خوب بین ماتریس حاصل از دندوگرام و ماتریس تشابه دایس می‌باشد.

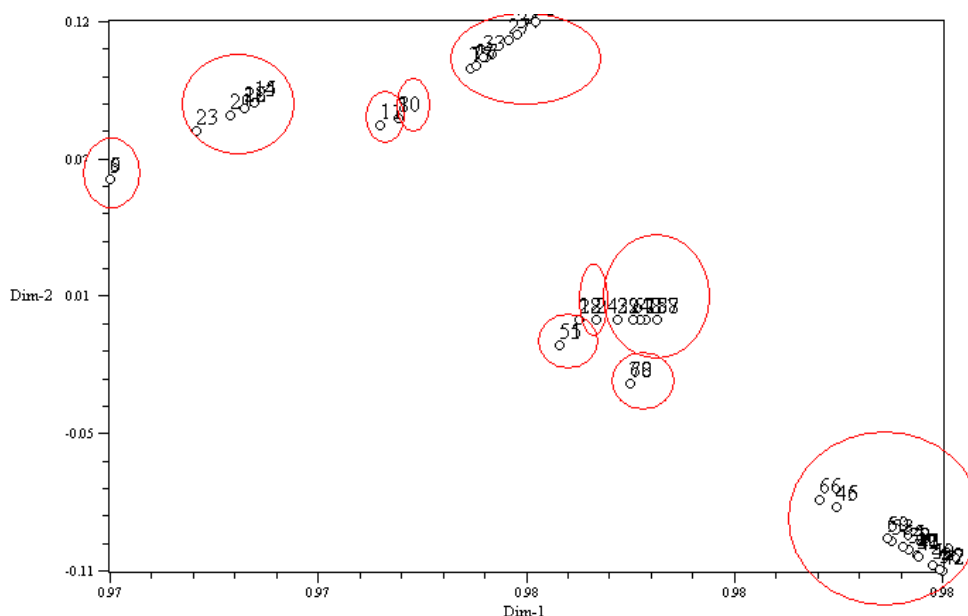
تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از نشانگر ISSR بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه دایس ژنوتیپ‌ها را در ضریب تشابه 0/96 به 10 گروه تقسیم‌بندی کرد (شکل 1). پولیگونی و همکاران (17) با مطالعه 4 رقم گردو در ایتالیا و انجام تجزیه خوشه‌ای گزارش کرد که ارقام در دو خوشه اصلی قرار گرفتند.

در 6 گروه اول فقط ژنوتیپ‌های باغ شماره 1 قرار گرفتند به طوری که در گروه اول 2 ژنوتیپ، در گروه دوم 7 ژنوتیپ، در گروه سوم 10 ژنوتیپ، در گروه چهارم فقط یک ژنوتیپ، در گروه پنجم 2 ژنوتیپ و در گروه ششم 2 ژنوتیپ دسته بندی شد. در گروه هفتم، 5 ژنوتیپ از باغ شماره 1، 2 ژنوتیپ از باغ شماره 2 و 1 ژنوتیپ از باغ شماره 4 قرار گرفتند.



شکل 1 - دندروگرام و گروه‌های حاصل از روابط ژنتیکی 56 ژنوتیپ گردو با استفاده از نرم افزار NTSYSpc v2.02 بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه Dice روی داده‌های حاصل از 9 آغازگر برتر ISSR

Figure1: Cluster analysis of genetic relationships of 56 walnut genotypes using the NTSYSpc v2.02 software according to UPGMA method and Dice similarity coefficient on data from 9 ISSR primers



شکل 2- تجزیه به مولفه (PCO) داده حاصل از نشانگر ISSR

Figure 2: Component analysis (PCO) of ISSR molecular marker data

کمتر از حد مورد انتظار بود. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای (شکل 1) و تجزیه به مولفه‌ها (شکل 2) نیز می‌توان نتیجه گرفت که فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با فاصله جغرافیایی موجود در باغ‌های گردو تا حدودی مطابقت داشت.

در جهت تکمیل این مطالعه، نویسنده پیشنهاد می‌کند که بهتر است ژنوتیپ‌های بیشتر و پرایمرهای بیشتری از مارکر ISSR نیز جهت صحت این ادعا که تنوع ژنتیکی پایین در این منطقه است، مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین می‌توان این مطالعه را با بررسی سایر مارکرهای مولکولی و مطالعه با وسعت بیشتری در سطح استان خراسان بزرگ گسترش داد.

به طور کلی با بررسی نتایج مطالعه حاضر و مقایسه با یافته‌های محققین گردو می‌توان گفت علی‌رغم اینکه میزان تنوع ژنتیکی گردو در بسیاری از مناطق بالاست اما گزارشاتی مبنی بر تنوع ژنتیکی پایین در جمعیت‌های گردو منتشر شده و متأسفانه در سال‌های اخیر این گزارشات سیر صعودی نیز داشته است. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات مختلف صورت گرفته در خصوص تنوع ژنتیکی پایین گردو، عوامل ذیل را می‌توان در این زمینه مؤثر دانست: بسیاری از ژنوتیپ‌ها در طول زمان و در اثر حوادث طبیعی مانند سرماهای شدید و ... از بین رفته‌اند، همین‌طور دخالت‌های انسان در جهت حذف جنگل‌ها به منظور ساخت و ساز و یا حذف درختانی که محصول آنان بازار پسند نیست و همین‌طور انتخاب و سپس تکثیر ژنوتیپ‌هایی که دارای صفات برتر هستند. مطالعات انجام شده در مورد شناسایی ژنوتیپ‌های برتر هر منطقه باعث می‌شود که این گزینش‌ها در آینده موجب حذف ژنوتیپ‌هایی شود که اگرچه بر اساس صفات مورفولوژیک مناسب نیستند اما صفات با ارزشی چون مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارند.

مورد دیگری که در این میان وجود دارد این است که با اینکه گردو تک پایه است و دارای دیکوگامی و عدم همزمانی گل‌های نر و ماده می‌باشد، اما گزارش شده به دلیل اینکه گردو خود ناسازگار نیست با تغییرات محیطی و همزمانی رسیدن گل‌های نر و ماده، خود گرده افشانی در آن افزایش می‌یابد که این مورد نیز باعث کاهش تنوع ژنتیکی گردو در طول زمان خواهد شد.

از این حیث این نگرانی وجود دارد که اگر این روند کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گردو رو به فزونی یابد، این محصول ارزشمند در زمره گونه‌های در معرض خطر قرار خواهد گرفت، که برای محقق نشدن این امر باید چاره‌ای اندیشید.

امید است تحقیق حاضر زمینه‌ای جهت شروع پژوهش‌های بیشتر در منطقه، حفظ و مدیریت ژرمپلاسم این محصول با ارزش و به حداکثر رساندن تنوع آن به منظور انجام برنامه‌های اصلاحی را در آینده فراهم نماید.

در این بین با بررسی نتایج، تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی در جمعیت مورد مطالعه گردو مشاهده می‌شود؛ با مطالعه یافته‌های سایر محققین گردو در دنیا مشخص می‌شود بر خلاف بسیاری از کشورها و مناطق گردو خیز دنیا که تنوع ژنتیکی بسیار زیادی بین ژنوتیپ‌های آنها وجود دارد، گزارشاتی نیز مبنی بر کاهش تنوع ژنتیکی گردو و شباهت فوق‌العاده ژنوتیپ‌ها و فرسایش ژنتیکی در جمعیت‌های گردو در بعضی مناطق وجود دارد. به طور مثال:

مالوتی و همکاران (13) با بررسی 11 جمعیت گردو با آلوزایم در ایتالیا تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی مشاهده کردند و توضیح دادند که با اینکه گردو تک پایه است و دیکوگامی هم دارد، اما تغییر در شرایط محیطی باعث هم زمانی رسیدن دانه گرده و آمادگی پذیرش کلاله خواهد شد و خود گرده‌افشانی را افزایش و تنوع ژنتیکی را کاهش خواهد داد.

همچنین فورناری و همکاران (6) با بررسی تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو توسط آلوزایم در آسیا و اروپا بیان نمودند که گونه گردو ایرانی خصوصاً در منطقه اروپا دچار فرسایش ژنتیکی شده و توصیه کردند که برای عدم کاهش تنوع باید مانع خود گرده‌افشانی و خویش آمیزی این گونه شده و دخالت‌های انسان را در تکثیر آن کاهش داد.

بایزیت و همکاران (7) با مطالعه تعدادی از ژنوتیپ‌های بومی گردو با نیاز سرمایی پایین از منطقه هاتای در ترکیه با مارکر AFLP اذعان داشتند که تنوع با اینکه از ژنوتیپ‌های موجود در طبیعت استفاده شد پایین است و این‌طور استنباط کردند که به دلیل اینکه وسعت کوچکی از منطقه مورد مطالعه قرار گرفته لذا شباهت زیادی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد و در واقع در جمعیت مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود ندارد.

ونگ و همکاران (23) با مطالعه بر روی 9 جمعیت گردو در مرکز و جنوب غربی چین به وسیله مارکر SSR تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی در آنها مشاهده کردند و بیان کردند فعالیت‌های بشر مانند جنگل‌زدایی، حذف ژنوتیپ‌ها و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در 100 سال گذشته، همچنین خود گرده افشانی که گاهاً در گونه گردو ایرانی نیز مشاهده می‌شود باعث این امر شده است.

وحدتی و همکاران (22) نیز با بررسی تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو در مناطق مختلف کرمان گزارش کردند که میزان هتروزیگوسیتی از حد مورد انتظار خیلی پایین‌تر بود که دلیل آن را خود گرده افشانی و دخالت‌های انسان دانسته‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

مارکر مولکولی ISSR تا حدودی توانست وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گردو را آشکار کند، اما میزان این تنوع ژنتیکی پایین و

منابع

- 1- Aly M.M., Robert A., Fjellstrom G., McGranahan G.H. and Parfitt E. 1992. Origin of walnut somatic embryos determine by RFLP and Isozyme analysis. HortScience 27 (1): 61-63
- 2- Bayazit S., Kaza, K., Golbitti S., Cevik V., Ayanogla H., and Ergul A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotyping from Hatay, Turkey. Scientia Horticulturae. 111: 394-398
- 3- Christopoulos M. rouskas D. tsantili E. Bebeli P.J. 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 125(4):584-592
- 4- Dogan Y, Kafkas S, Sütyemez M, Akca Y, Türemis N, 2014. Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers. Scientia Horticulturae 168 (2014) 81–87
- 5- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13-15.
- 6- Fornari B., Canata F., Spada M. And Malvolti M. E. 1999. Alosyme analysis of genetic diversity differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations .Forest Genetics. 6(9): 115-127.
- 7- Fornari B., Malvolti M. E., Taurchini D., Fineschi S., Beritognolo I., McCaglia E. And Cannata F. 2001. Isozym and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalized European and Asiatic walnut (*Juglans regia*) populations. Acta Horticulturae. 544: 167-178
- 8- Foroni I., Woeste K., Monti L. M. and Rao R. 2006. Identification of ‘Sorrento’ walnut using simple sequence repeats (SSRs). Genetic Resources and Crop Evolution.85: 311-321
- 9- Haghjooyan R. 2002. Investigation of Toysarkan walnut genetic diversity and 4 walnut population in Iran with morphological and molecular markers. P.hD Thesis. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran (In persian)
- 10- Jia XD Wang T, Zhai M, Li YR, Guo ZR.2011. Genetic diversity and identification of Chinese-grown pecan using ISSR and SSR markers. Molecules. 2011 Dec 6;16(12):10078-92
- 11- Ji A., Wang Y., Wu G., Wu W., Yang H., Wang Q. 2014. Genetic Diversity and Population Structure of North China Mountain Walnut Revealed by ISSR. American Journal of Plant Sciences, 2014 (5): 3194-3202
- 12- Mahmoodi R., Rahmani F., Rezayi R. 2011. Investigation of Genetic Diversity Some Persian walnut Genotypes with ISSR Molecular Marker. Seventh Conference of Biotechnology Islamic Republic of Iran. (In Persian with English abstract)
- 13- Malvolti M. Paciucci M. Cannata F, Fineschi S.1993. Genetic variation in Italian population of Juglans Regia. L. Acta horticulture 311.
- 14- Moradi M.H., Rostamzadeh J., Rashidi A., Vahabi KH., Karimi F., Ahmadi M. 2006. Investigation of Genetic Diversity with ISSR Molecular Marker. Conference findings Agriculture and Natural Resources (West Country) - Iran, Sanandaj -2006 (In Persian with English abstract)
- 15- Niceses F. P., Hormaza J. I. and McGranahan G. H. 1998. Molecu characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101:199-206
- 16- Orel G., Marchant A. D., McLeod J. A. and Richards G. D. 2003. Characterisation of 11 Juglandaceae genotypes based on morphology cpDNA and RAPD. HortScience. 38(6):1178-1183.
- 17- Pollegioni P., Bartoli S., Cannata F., Malvoti ME, 2003. Genetic differentiation of four Italian walnut varieties by inter simple sequence repeat. Journal of Genetics and Breeding, 57(3) : 231 - 240
- 18- Pollegioni P., Major A., Bartoli S., Ducci F., Proietti R., and Malvolti M.E. 2005. Application of microsattelite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus Juglans. Acta Horticulturae, 705:191-197.
- 19- Potter D., Gao F., Aiello G., Leslie C. and McGranahan G. H. 2002. Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science. 127:75-81.
- 20- Tian L., xiang A., Li-SI Z, Hai Rong W, Qing L. 2011. ISSR Analysis of Genetic Diversity among Seedling Walnut (*Juglans* spp.)Populations. Journal of Plant Genetic Resources 2011-04
- 21- Vahdati K. 2000 .Walnut situation in Iran. Nucis-Newsletter. 9: 32-33.
- 22- Vahdati K. Mohseni S. Karimi R, Barzehkar R. Amiri R.Mozaffari M. and Woeste K. 2014. Genetic diversity and gene flow of some Persian walnut populations in southeast of Iran revealed by SSR markers. Plant Systematics and Evolution
- 23- Wang H., Pei D., Gu R., Wang, B.2008. Genetic Diversity and Structure of Walnut Populations in Central and Southwestern China Revealed by Microsatellite Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 133(2):197–203. 2008.
- 24- Wani N., Bhat A., Ahmad F., Akhter S., Razvi M., and Mir M. 2010. Molecular markers and their application in walnut improvment. International Journal of Current Research. 3:006-011



Study of Genetic Diversity of Some Persian walnut Genotypes in Mashhad Commercial Orchards by using ISSR Marker

Sh. Attar¹ - Gh. Davarynejad^{2*} - L. Samiee³ - M. Moghadam⁴

Received: 25-12-2016

Accepted: 05-08-2017

Introduction: Persian walnut (*Juglans regia* L.), belonging to the Juglandaceae family, has its natural origin in the mountainous regions of central Asia and especially northern forests of Iran. Most walnut genotypes are seedling and sexually reproduced. Conducting studies on the genetic structure of these genotypes to identify, select and maintain their genetic resources is important. Identifying and collecting local varieties of fruit trees is considered as the first step on the path of breeding programs and lack of information regarding plants genetic characteristics causes the breeding work to be done slowly. Various methods have been used for studying genetic diversity and determining the genetic relationship between European and Asian varieties of walnut and identifying commercial walnut varieties, among which we can mention: Morphologic indices, Alosyme, Isozym, RFLP, RAPD, AFLP and ISSR markers. ISSR molecular marker was used in order to investigate genetic diversity of some genotypes of Persian walnut (*Juglans regia* L.) in Mashhad orchards. .

Materials and Methods: To begin with, about 56 walnut trees from 4 orchards in Mashhad (Esteghlal (1), Golestan (2), Alandast (3) and Emam Reza (4)) were selected and tagged from 2014 to 2016. In the spring of 2014 with the beginning of trees growth and opening of leaves, a number of leaves from each genotype were collected. After DNA extraction, the quality of samples by agarose gel (1 percentage) and electrophoresis method and quantity of them via spectrophotometer device at 260 and 280 nm wavelengths were determined. First, 24 primers of ISSR marker were prepared and after initial evaluation on 5 random genotypes, 9 primers with high polymorphism and repeatability were selected for further investigation. For PCR reaction, Amplicon kit (code 180 301, made in Denmark) was used. Gel electrophoresis images of primers that produced polymorphic bands with suitable resolution were analyzed manually. After scoring the bands, in which 0 used for showing the absence of a band and 1 showing the presence of a band in each sample, 1 and 0 numbers were changed to matrix by using NTedit software. Genetic similarities of samples were calculated by using NTSYSpc software, SIMQUAL method and DICE similarity coefficient. Dendrogram by cluster analysis was drawn by using UPGMA method. Principle coordinate analysis (PCO) was performed using the NTSYS software and grouping samples were evaluated in a two-dimensional plot.

Results and Discussion: Results showed that from 9 primers in total, 118 bands amplified were in 300 to 3000 base pairs, while 29 bands were polymorphic. The number of amplified fragment for each primer was different so that UBC 844 (14 bands) had the highest and UBC 890 (8 bands) had the lowest amplified bands. The average amplified fragments for each primer was 9.83. The percentage of polymorphic in various primers was different. Maximum polymorphism (80%) of the primers was observed in UBC830. In general, according to the percentage of polymorphic bands, low adjustment to any changes in the environment was indicated. This can be used as an indicator to determine the value of diversity and genetic erosion. In genotypes cluster analysis, clustering was performed based on Dice similarity coefficient and UPGMA method, and 10 clusters were formed. ISSR molecular marker somewhat revealed genetic diversity among walnuts genotypes, whereas the genetic diversity was lower than expected. In general, by reviewing the findings in other parts of the world about walnut genetic diversity and comparing them with the results of this study, despite existing high genetic diversity among walnuts in many areas, some reports of low genetic diversity among walnuts populations have been published and unfortunately in recent years these reports has made more attention. Based on the results of several studies reporting low genetic diversity among walnuts, the following factors can be effective in this problem: natural disasters, human impacts such as deforestation and selection and propagation of superior genotypes, and sometimes walnuts self - pollination. In this respect, there is concern that if this trend of decreasing genetic diversity in the walnut population continues, this invaluable crop will be in danger of

1, 2 and 4-Ph.D student, Professor and Asociated Professor of Horticultural Science, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding Author Email: Davarynej@um.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Ornamental Plants, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad

extinction. So we should think about a remedy. Finally, this investigation can be used as a start for conducting more researches in the region to maintain and manage this valuable crop germplasm and maximize genetic diversity for performing breeding programs in the future.

Keywords: Base pair, Cluster, Local varieties, Primer, Similarity



غربالگری هموکاریون‌ها و تولیدنژاد دورگ جدید قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره

سیده مرضیه نوراشرف الدین¹ - محمد فارسی^{2*} - فرج اله شهریاری³ - جواد جانپور⁴

تاریخ دریافت: 1396/03/01

تاریخ پذیرش: 1396/05/01

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) رایج‌ترین قارچ خوراکی در ایران و دنیا است، اما به‌دلایلی از جمله استفاده از نژادهای کم محصول و پسروی نژادی، عملکرد این قارچ در کشور کمتر از متوسط عملکرد آن در دنیا می‌باشد. یکی از برنامه‌های به نژادی، تولید نژاد F1 حاصل از آمیزش هموکاریون‌ها است که مستلزم در اختیار داشتن جدایه‌های هموکاریون می‌باشد. در این مطالعه ابتدا 160 جدایه تک‌اسپور کند رشد از نژاد A15 جداسازی شد و سپس براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، از بین آنها 18 نمونه بررسی و انتخاب شدند. در مرحله‌ی بعد، از نشانگر هم‌بارز ریزماهواره (SSR) جهت شناسایی هموکاریون‌ها استفاده شد. ده آغازگر که در نمونه‌های شاهد مادری دارای چندشکلی بودند برای نمونه‌های مورد آزمایش نیز استفاده شدند. جدایه‌ها براساس حضور و عدم حضور باندهای چندشکل در دو گروه کلی هتروآلیک و هموآلیک قرار گرفتند و هفت جدایه که در تمامی جایگاه‌های بررسی شده الگوی باندی تک باند نشان دادند به عنوان جدایه‌ی هموکاریون در نظر گرفته شدند. به منظور محاسبه سطح تنوع ژنتیکی بین 7 جدایه هموکاریون به دست آمده، ماتریس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc محاسبه شد و دندروگرام مربوطه ترسیم گردید. تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین 0/17 تا 0/67 متغیر بود. در مرحله‌ی بعد نمونه‌های شماره 4 و 8 با بیشترین فاصله ژنتیکی نسبت به سایر نمونه‌ها جهت تشکیل هیبرید در تلاقی شرکت داده شدند. نتیجه این تلاقی، تولید هیبرید N1 بود که با افزایش ناگهانی در رشد و تولید میسلیم هوایی در محل الحاق همراه بود که در مقایسه با والد‌های هموکاریون، سرعت رشد بیشتری داشت. در ادامه، جهت تأیید مولکولی هیبرید حاصل، واکنش PCR-SSR با استفاده از یک پرایمر (AbSSR 45) انجام گرفت. همانطور که انتظار می‌رفت در هیبرید N1 همانند نمونه‌ی شاهد هتروکاریون، دو باند قابل امتیازدهی حاصل شد که نشان‌دهنده‌ی وجود دو هسته‌ی غیرخواه‌ری در هر واحد سلولی آن می‌باشد. نتایج نشان دادند که با استفاده از نشانگر SSR می‌توان با احتمالی بیش از 99/8 درصد نسبت به قطعیت هموکاریونی پس از اجرای آزمایش با 10 آغازگر دست یافت و به این ترتیب از آنها در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید هیبرید بهره برد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، تنوع مورفولوژیک، نشانگر هم‌بارز، هتروکاریون

مقدمه

شده است، اما عملکرد این قارچ در کشور کمتر از متوسط عملکرد آندر دنیا می‌باشد (10). یکی از دلایل مهم این کاهش عملکرد، استفاده از نژادهای کم محصول و پسروی نژادی⁵ می‌باشد (11، 18 و 51). یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل تداوم برنامه‌های نژادی به منظور حفظ و بهبود نژادهای مادری و تولید نژادهای جدید می‌باشد (10 و 11). از جمله این برنامه‌ها، تولید نژاد F1 حاصل از آمیزش هموکاریون‌ها است که مزایای زیادی دارد و یکی از مهم‌ترین روش‌های اصلاحی قارچ *Agaricus bisporus* است (56 و 11). جداسازی میسلیم‌های هموکاریون و تشخیص و تأیید تلاقی‌های موفق بین هموکاریون‌ها یک پیش‌شرط ضروری برای تولید یک نژاد هیبرید برتر به حساب می‌آید، اما

از میان قارچ‌های خوراکی، قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) رایج‌ترین قارچ خوراکی در ایران و دنیا است که در سال‌های اخیر به دلیل ارزش غذایی و دارویی زیادی که دارد (45، 32، 11، 48) توجه زیادی به تولید و پرورش آن معطوف

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*) نویسنده مسئول: (Email: Farsi@um.ac.ir)

4- عضو هیأت علمی گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

با توجه به اینکه چرخه‌ی زندگی قارچ دکمه‌ای از نوع هموتالیک ثانویه است، استفاده از روش‌های سنتی مانند تفاوت‌های مورفولوژیکی و آیزوایمی به دلیل تأثیرپذیری از محیط، برای انجام این کار کارایی لازم را ندارند (۱۹،۲۷، 31، ۴۳، ۴۶). بنابراین در دوده‌ی اخیر برای مطالعات ژنتیکی و جداسازی هموکاریون‌ها در قارچ‌های خوراکی از نشانگرهای مولکولی مانند¹RFLP (5)،²RAPD (21، 35، 53 و 58)،³AFLP (2)،⁴ISSR (38، 39 و 40) و⁵SSR استفاده شده است (3، 5، 12، 13، 24 و 28).

از بین نشانگرهای مولکولی فوق، استفاده از نشانگر هم بارز SSR جهت جداسازی هموکاریون‌ها موفقیت آمیزتر بوده و کار با آن نیز ساده‌تر است (۴۷، ۴۹، ۵۷، ۵۹). بیراتی و همکاران (3) نشان دادند که استفاده از این نشانگر در مقایسه با روش‌های مورفولوژیکی از اطمینان بیشتری برخوردار است و همچنین کارایی خوبی در جداسازی هموکاریون‌ها از هتروکاریون‌ها در قارچ دکمه‌ای *A. bisporus* دارد. همچنین فولگن و همکاران (12) 33 نشانگر SSR را از DNA قارچ *A. bisporus* شناسایی کردند و پس از استفاده جهت شناسایی نژاد تجاری و بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای در این قارچ، این نشانگر را جهت آنالیز ژنتیکی قارچ دکمه‌ای، مناسب و کارآمد دانستند.

تولید نژادهای جدید و پرمحصول یکی از اولویتهای اصلی برنامه‌های اصلاحی قارچ خوراکی است. با اینکه در سال‌های گذشته سه نژاد هیبرید در کشور تولید شده است (10 و 15)، اما همچنان نیاز به نژادهای پرمحصول جهت افزایش تولید و میزان سودآوری واحدهای تولید قارچ احساس می‌شود. در این پژوهش با استفاده از نشانگر SSR جدایه‌های هموکاریون قارچ *A. bisporus* جداسازی شده و به منظور تولید بذر هیبرید با یکدیگر تلاقی داده شدند و یک نژاد تجاری جدید تولید گردید.

مواد و روش‌ها

کلاهی مادر قارچ دکمه‌ای سفید، نژاد A15 از مرکز زیست-فن‌آوری قارچ‌های خوراکی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه گردید. یک عدد قارچ رسیده و تمیز که پرده‌ی زیرکلاهی آنها بسیار کشیده و نازک شده بود، انتخاب و قسمت پایه و پرده زیر کلاهی حذف گردیدند. کلاهی روی کاغذ صافی سترون، در یک پتری قرار گرفته و با یک بشر سترونپوشانده شد. بعد از گذشت 72 ساعت اسپورها به روی کاغذ صافی منتقل شدند. یک مایع تعلیقی غلیظ از اسپورها تهیه و با استفاده از یک لام گلول شمار، غلظت اسپورها بر روی 15000

اسپور بر میلی‌لیتر تنظیم و 300 میکرولیتر از آن، به ظرف پتری محتوی محیط کشت⁶ PDA منتقل شد. برای به حداقل رساندن آلودگی باکتریایی از جنتامایسین با غلظت 40 میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. ظروف به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت سه تا چهار روز از زمان کشت اسپورها، بررسی روزانه وضعیت رشد اسپورها به صورت چشمی در زیر نور مهتابی و یا با استفاده از میکروسکوپ، انجام گرفت. تک-اسپورهایی که رشد سریعی داشتند حذف شدند و تک‌اسپورهایی که رشدتر به ظروف پتری جدید حاوی محیط کشت عصاره کمپوست - آگار⁷ (CE/A) انتقال و در دمای 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این کشت را به نام کشت تک اسپور اولیه در نظر گرفتیم (10 و 21). قطر پرگنه هر یک از ایزوله‌های تک اسپور مورد مطالعه به مدت یک ماه و به فواصل یک هفته‌ای به طور منظم در محیط CE/CYM اندازه‌گیری شد (شکل 2). نمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک هفته پس از کشت، اندازه‌گیری سرعت رشد جدایه‌های تک اسپوری شروع شد و در نهایت پرگنه‌ها در سه کلاس تند رشد، رشد میانه و کند رشد طبقه‌بندی گردیدند.

مسیلوم تک‌اسپورهایی جداسازی شده در محیط کشت مایع CE به مدت 25 روز کشت شد. استخراج DNA با روش CTAB همراه با تغییرات اندکی انجام شد (7، 9 و 52). مقدار و کیفیت DNAی ژنومی توسط الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد. در این پژوهش 10 آغازگر ذکر شده در جدول 1 (12) استفاده گردید و واکنش PCR در حجم 20 میکرولیتر برای تک‌اسپورهایی جداسازی شده و نمونه مادری (شاهد هتروکاریون) انجام شد. چرخه حرارتی و مواد مورد نیاز جهت انجام PCR شامل سه دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، 34 چرخه شامل 30 ثانیه واسرشت‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت 30 ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر آغازگر (52-58) درجه سانتی‌گراد (جدول 1) و 30 ثانیه گسترش در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود. برای بررسی نتایج آزمون PCR نیز ژل آغازگر دو درصد تهیه شد (12). براساس مکان‌های تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر، حضور باند با "1" و عدم حضور باند با "0" امتیازدهی شد. داده‌ها پس از ورود به محیط Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار NTSYSpc (2.02 e) منتقل شدند و از روش UPGMA برای آنالیز فاصله ژنتیکی استفاده گردید. در نهایت ماتریس شباهت ژنتیکی با استفاده از ضریب تعیین جاکارد محاسبه شد. با استفاده از نتایج ماتریس شباهت ژنتیکی، جدایه‌های هموکاریون دور از هم جهت بدست آوردن هیبرید بهتر، انتخاب و با یکدیگر

6- Potato Dextrose Agar

7-Compost Extract Agar

1- Restriction Fragment Length Polymorphism
2- Random Amplification of Polymorphic DNA
3- Amplified fragment of Length Polymorphism
4- Inter Simple Sequence Repeat
5- Simple Sequence Repeat

تلاقی داده شدند. این عمل با قرار دادن جدایه‌های تک اسپور در کنار یکدیگر در داخل یک محیط کشت صورت گرفت. میسلیوم‌ها در محل تلاقی رشد دو میسلیوم، تشکیل هیبرید داده و هیبریداسیون با کمک نشانگر SSR تایید گردید (شکل 6- الف).

جدول 1- لیست آغازگرهای SSR مورد استفاده

آغاز گر Primer	توالی نوکلئوتیدی Sequence (5→3)	دمای اتصال Annealing temperature (° C)
AbSSR 23	F*- TTTGGGATGTGACCAGACTT R-AACGTTGGGTTCAATGAAAA	52
AbSSR45	F-CACCTTACACGGCCATTGAT R-AAAACCTTCGGGCATTTCCTT	52
AbSSR65	F-ACCTCAACGATTCCAACGAC R-TCCATAAACACCCCTTCTCG	52
AbSSR09	F-ACAAGAAGGGGAGGATTGAG R-ATAGTCGCGTAACCCCTCTT	57
AbSSR06	F-ACCACATTCTGGAACGAA R-TTAATGCTCTTGCTTCGAC	58
AbSSR63	F-CTGGATATGGGGAGATGTGG R-ATTGGACCAGCCAAAGACAC	56
AbSSR62	F-GTTGGTCACGAACTCATGCT R-CCCAATCACCTCCTTGTGT	52
AbSSR58	F-ATGTCGAGGAGGAGGAGGAT R-AGGGAGAGGGAGAGGGATT	52
AbSSR04	F-ACAACAACCGCCACCACCAT R-CAGGCGTATATCGCTGTTGCTG	58
AbSSR36	F-CGTTGATGGAGTTGACTGAG R-ACAACAAAATCGTCGTGAGG	55

F= Forward primer, R= Reverse primer*

نتایج و بحث

تندش بازیدیوسپورها: در این پژوهش از تک اسپورها به عنوان منبع جداسازی هموکاریون‌ها استفاده شد زیرا بر اساس پژوهش‌های گذشته تک اسپورها یک منبع مناسب برای این کار محسوب می‌شوند (22، 23، 24، 25 و 26). پس از گذشت ده روز از کشت اسپورها در محیط کشت PDA، تندش بازیدیوسپورها آغاز شد و با مشاهدات میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی 10 برابر عدسی شیئی)، قابل مشاهده بود (شکل 1). تا دو هفته پس از کشت اسپور، بررسی و جدا کردن تک‌اسپورها ادامه یافت و در نهایت 160 جدایه تک‌اسپور کند رشد از نژاد A15 به دست آمد.

در فرآیند کشت اسپورهای قارچ دکمه‌ای سفید، معمولاً اسپورهای هتروکاریون‌ها زودتر جوانه می‌زنند و با توجه به اینکه نرخ رشد کلونی با زمان جوانه‌زنی مرتبط است (60) می‌توان گفت کلونی‌هایی که زودتر رشد می‌کنند به احتمال زیاد هتروکاریون هستند. در نتیجه در این آزمایش برای افزایش احتمال گزینش هموکاریون‌ها، بازیدیوسپورهایی که سریعتر جوانه زدند، را حذف کرده و 160 بازیدیوسپور کند رشد برای انتقال به محیط کشت CE/CYM انتخاب شدند و یک ماه پس از انتقال تک‌اسپورها (پرگنه‌های منفرد)، شبکه

میسلیومی هر تک‌اسپور به قدر کافی سطح محیط کشت را فرا گرفت. نرخ رشد کم هموکاریون‌ها می‌تواند یک معیار استاندارد برای تمایز آنها از هتروکاریون‌ها باشد. تفاوت رشد بین هموکاریون‌ها و هتروکاریون‌ها می‌تواند منشأ ژنتیکی داشته باشد و تحت تأثیر ژنوم هسته و میتوکندری است (8 و 24). ژو و همکاران (60) نشان دادند که نرخ رشد در هموکاریون‌ها با یک نشانگر بر روی کروموزوم شماره 3 قارچ *A.bisporus* مرتبط است. همچنین بستاید و همکاران (8) نیز گزارش کردند که ژنوم میتوکندری می‌تواند نرخ رشد در این قارچ را تحت تأثیر قرار دهد.

تنوع در میان جدایه‌های خالص: از بین 160 جدایه مورد بررسی، 53 جدایه در کلاس خیلی کند، کند رشد و رشد میانه و بقیه در کلاس رشدی سریع قرار گرفتند (جدول 2). جدایه‌هایی که در کلاس رشدی سریع قرار داشتند و همچنین جدایه‌های متعلق به کلاس سرعت رشد میانه که تیپ رشدی رشته‌ای از خود نشان دادند (احتمالاً هتروکاریون) حذف شدند. در نهایت بر اساس سرعت رشد، تعداد 18 جدایه که تقریباً 11 درصد کل جدایه‌ها را تشکیل می‌دادند به عنوان هموکاریون احتمالی شناخته شدند. به طور معمول فراوانی هموکاریون‌ها کمتر از هتروکاریون‌ها می‌باشد، به طوری که کریگن و همکاران (23) نیز گزارش کردند که حدود 10 درصد تک اسپورهای قارچ *A.*

bisporus رامیسلیوم هموکاریون تشکیل داده است.



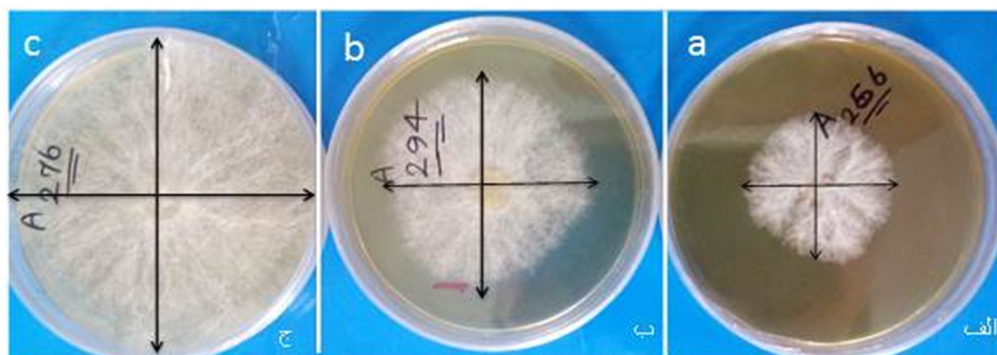
شکل 1- تک اسپور قارچ دکمه‌ای سفید در مراحل اولیه رشد (100×)

Figure 1- A single spore of the white button mushroom in early stages growth (100×)

هفته، پرگنه میسلیوم قارچ دکمه‌ای سطح محیط کشت اکثر شیشه‌ها را پر کرد و نمونه‌ها آماده برداشت جهت استخراج DNA بودند. در نمونه‌هایی که بیش از چهار هفته از کشت آنها می‌گذشت رنگ میسلیوم قهوه‌ای می‌شد، که این قهوه‌ای شدن می‌تواند تحت تاثیر مواد فنولیکی تولیدشده توسط میسلیوم یا فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده رنگ از جمله پلی‌فنل اکسیداز باشد (20) که فعالیت آنها به تغییر pH محیط کشت در طول زمان رشد میسلیوم حساس می‌باشد (36). برای رفع این مشکل، میسلیوم جدایه‌ها حداکثر ظرف مدت سه هفته برای استخراج استفاده شدند.

در بررسی‌های مورفولوژیکی انجام شده بر روی میسلیوم‌های مورد بررسی، انواع مختلفی از تیپ رشدی از جمله تیپ‌های رشدی رشته‌ای، پنبه‌ای و نمدی میسلیوم مشاهده شد (شکل 3). به طور مشابهی در آزمایشات دیگر محققان، شکل میکروسکوپی میسلیوم و برخی از شاخص‌های مورفولوژیک در بین جدایه‌های خالص متفاوت بود (10 و 11). این تفاوت نشان از رشد غیرمعمول میسلیوم نسبت به حالت جارویی می‌باشد (17).

کشت مایع میسلیومی، استخراج DNA و بررسی کیفیت آن: جهت استخراج DNA ژنومی، کشت مایع میسلیومی 18 تک اسپور انتخاب شده از مرحله قبل انجام گرفت. پس از گذشت چهار

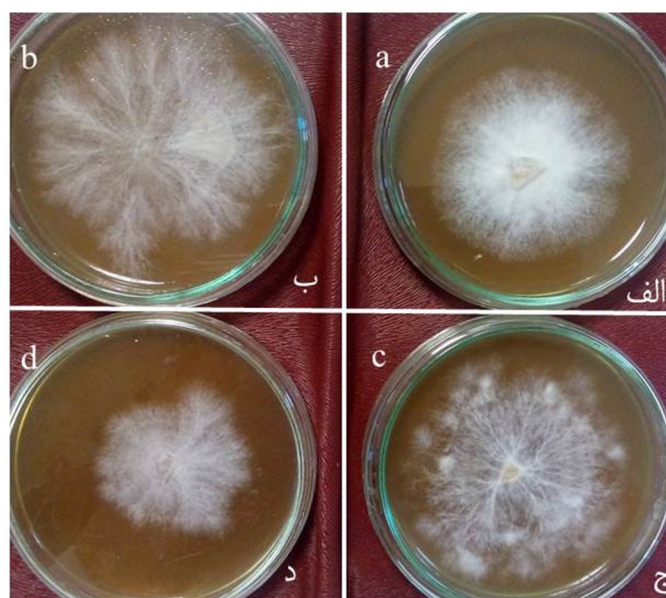


شکل 2- تنوع سرعت رشد پرگنه جدایه‌های تک اسپور قارچ دکمه‌ای سفید دو هفته پس از کشت. الف) جدایه کند رشد ب) جدایه دارای رشد متوسط ج) جدایه دارای رشد سریع

Figure 2-Variation in growth rate of single spore isolates of the white button mushroom two weeks after the cultivation. a) Slow growing strain, b) Medium growing strain c) Fast growing strain

جدول 2- تعیین سرعت رشد جدایه‌های تک اسپورد *A. bisporus*Table 2- Determining the growth rate of single spore isolates of the *A. bisporus*

میانگین سرعت رشد در هفته	نوع کلاس	تعداد جدایه‌ها	فراوانی نسبی ایزوله‌ها
The average growth rate for the week	The type of class	The number of isolates	The relative frequency of isolates
کمتر از 3 میلی‌متر Less than 3mm	خیلی کند رشد slow growth	5	3.12
مساوی 3 و کمتر از 6 میلی‌متر 3 to 6 mm	کند رشد Slow growth	15	9.37
مساوی 6 و کمتر از 9 میلی‌متر 6 to 9 mm	رشد میانه Moderate growth	33	20.62
بیشتر از 9 میلی‌متر Higher than 9 mm	رشد سریع Fast growth	107	66.87
جمع کل Total		160	100

شکل 3- تنوع جدایه‌های *A. bisporus* از لحاظ تیپ رشدی پرگنه. الف) رشد پنبه‌ای

(ب) رشد رشته‌ای (ج) رشد رشته‌ای و در انتهای میسلیم به صورت پنبه‌ای (د) رشد نمدی

Figure 3-Variation of *A. bisporus* isolates in terms of colony growth type, a) Apprised, b) Strandy, c) Strandy and at the end apprised, d) Appressed concentric ring

استفاده شده در والد هتروکاریون که به عنوان شاهد، در نظر گرفته شده بود دارای دو باند قابل امتیازدهی می‌باشند. در سایر نمونه‌های مورد مطالعه، برخی نمونه‌ها الگوی بانندی شبیه والد هتروکاریون خود-حضور دو باند - و برخی دیگر تنها یکی از دو باند والدی را دارا بودند که با نتایج بدست آمده از پژوهش‌های دیگر همخوانی دارد (3، 37 و 50). شکل (4) الگوی بانندی آغازگر AbSSR45 حاصل از جدایه‌ها را نشان می‌دهد. طبق نقشه‌ی ژنتیکی ارائه شده توسط فوئولونگ و همکاران (13)، هر یک از نشانگرهای SSR استفاده شده در این آزمایش، تنها دارای یک جایگاه در سراسر ژنوم *A. bisporus* می‌باشند، در نتیجه انتظار می‌رود به ازای هر نوع هسته در واحد سلولی

این تغییر کوچک، کیفیت DNA بدست آمده را تا حد زیادی افزایش داد. راندمان استحصال DNA از جدایه‌های کند رشد انتخاب شده جهت استخراج DNA در مقایسه با نمونه‌ی هتروکاریون انتخاب شده به عنوان شاهد بسیار پایین بود که با توجه به سرعت رشد پایین نمونه‌های هموکاریون قابل توجه می‌باشد، بنابراین توصیه می‌شود در مطالعات بعدی از چند تکرار کشت مایع برای هر نمونه استفاده شود تا حجم میسلیم افزایش پیدا کند و DNA مورد نیاز به مقدار کافی به دست آید.

تغییرات الگوی بانندی در میان 18 جدایه‌ی تک اسپور: با مشاهده‌ی نتایج حاصل از ژل آغاز، مشخص شد که هریک از آغازگرهای

هموکاریون‌ها را می‌توان از هتروکاریون‌ها تمایز داد. نتایج فوق تأییدی بر قابلیت مناسب نشانگر SSR در تشخیص هموکاریون‌ها از هتروکاریون‌ها می‌باشد.

میسلیوم، یک باند قابل امتیازدهی حاصل شود به طریقی که در نتاج هتروکاریون با دارا بودن دو هسته‌ی متفاوت، دو باند و در نتاج هموکاریون که دارای هسته‌های یکسان می‌باشند، یک باند قابل امتیازدهی حاصل شود. با توجه به همباز بودن این نشانگر،



شکل 4- الگوی باندى ایجاد شده توسط آغازگر AbSSR 45 بر روی ژل آگارز، m: سایزمارکر 100bp plus، 1: شاهد هتروکاریون، 2-19: جدایه‌های تک‌اسپور

Figure4 – Banding patterns generated by AbSSR45 primer on agarose gel, m: DNA ladder 100bp plus, 1: Heterokaryons control, 2-19: Single-spore isolates

هموزیگوس بودند.

گروه‌بندی جدایه‌های هموکاریون بر اساس فاصله ژنتیکی:

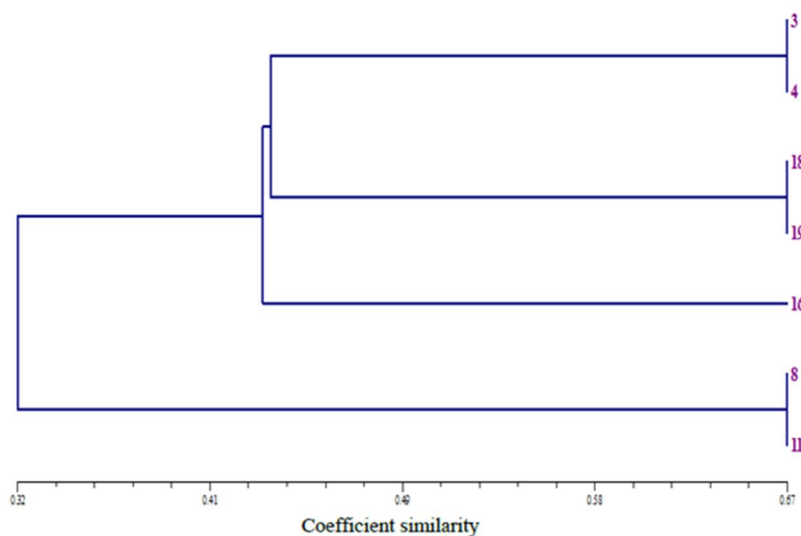
هفت هموکاریون از نژاد A15 قارچ دکمه‌ای سفید مورد بررسی بدست آمد. به منظور محاسبه فاصله ژنتیکی بین هریک از این جدایه‌ها از ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد و دندروگرام ترسیم گردید. بر اساس داده‌های SSR، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین 17٪ تا 67٪ متغیر بود (شکل 5) و جدول (4).

تأیید مورفولوژیکی و مولکولی دورگ حاصل: با توجه به نتایج حاصل از ماتریس شباهت ژنتیکی و این موضوع که دو هموکاریون، هرچه از شباهت کمتری با یکدیگر برخوردار باشند امکان رسیدن به یک هیبرید برتر بیشتر خواهد بود (10 و 11)، دو نمونه با شماره‌های 4 و 8 با کمترین میزان تشابه ژنتیکی نسبت به سایر نمونه‌ها (17٪)، جهت تشکیل هیبرید در تلاقی شرکت داده شدند. نتیجه این تلاقی تولید هیبرید N1 می‌باشد که با افزایش ناگهانی در رشد و تولید میسلیوم هوایی در محل الحاق همراه بود (شکل 6 -الف)، هیبرید N1 به عنوان یک نژاد جدید معرفی می‌شود که در مطالعات آینده از نظر عملکرد می‌تواند با نژادهای تجاری موجود قابل مقایسه باشد.

همانطور که انتظار می‌رفت از هریک از نشانگرها، دو باند قابل امتیاز دهی در والد هتروکاریون مادری که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، حاصل شد که نشان‌دهنده وجود دو هسته‌ی غیرخواهری در هر واحد سلولی آن می‌باشد (12). به منظور تفسیر باندهای حاصله از هر آغازگر، در صورت حضور باند "1" و عدم حضور باند "0" در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج خلاصه شده نشانگر SSR موجود در جدول (3)، از 18 جدایه بدست آمده، 11 جدایه‌ای که دارای حداقل یک جایگاه هتروزیگوس بودند - داشتن هر دو باند مشاهده شده در والد مادری - به عنوان جدایه‌های هتروآلیلیک و هفت جدایه‌ای که در تمام مکان‌های ژنی بررسی شده کاملاً هموزیگوس بودند - دارای تنها یکی از باندهای مشاهده شده در والد مادری - به عنوان جدایه‌های هموآلیلیک دسته‌بندی شدند. از یازده جدایه هتروآلیلیک، هشت جدایه در تمام مکان‌های ژنی الگوی باندى مشابه والد هتروکاریون خود نشان دادند و هیچ‌گونه تنوع آلی در آن‌ها مشاهده نشد (دارای 10 جایگاه هتروزیگوس) و یک جدایه در تمامی مکان‌های ژنی به جزء یک جایگاه، الگوی باندى شبیه والد هتروآلیلیک خود نشان داد (دارای نه جایگاه هتروزیگوس و یک جایگاه هموزیگوس) و دو جدایه دارای تعداد متفاوت جایگاه هتروزیگوس و

جدول 3- نتایج خلاصه شده ارزیابی باندهای حاصل از نشانگرهای SSR
Table 3- Summary results Evaluation of bands obtained from SSR markers.

تعداد جایگاه هموزیگوس	تعداد جایگاه هتروزیگوس	جدایه های A15
No. homo locus	No. hetero locus	A15 isolates
0	10	1=control
0	10	2
10	0	3
10	0	4
0	10	5
7	3	6
0	10	7
10	0	8
4	6	9
0	10	10
10	0	11
1	9	12
0	10	13
0	10	14
0	10	15
10	0	16
0	10	17
10	0	18
10	0	19



شکل 5- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA برای 7 جدایه هموکاریون *A. bisporus* با استفاده از نشانگرهای SSR
Figure 5- UPGMA dendrogram presentation for SSR markers differentiation of 7 homokaryon isolates of *A. bisporus*

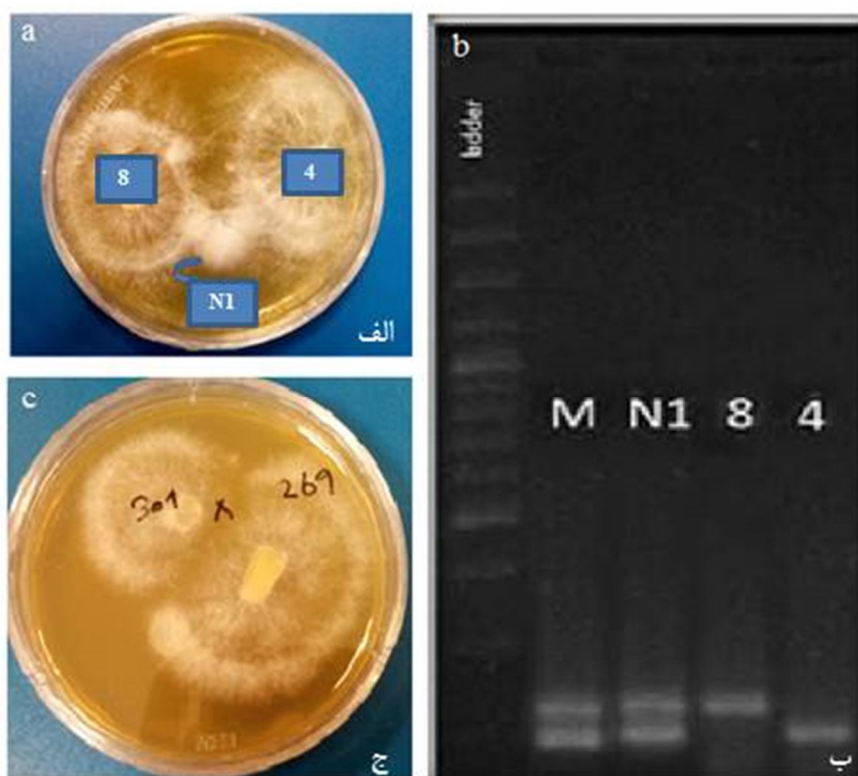
جدول 4- ماتریس شباهت ژنتیکی برای 7 جدایه هموکاریون *A. bisporus* بر اساس داده های SSR
Table 4- The genetic similarity matrix 7 homokaryon isolates (*A. bisporus*) based on SSR data

	3	4	8	11	16	18	19
3	1						
4	0.6	1					
8	0.3	0.17	1				
11	0.5	0.3	0.6	1			
16	0.4	0.4	0.3	0.3	1		
18	0.3	0.5	0.2	0.2	0.5	1	
19	0.3	0.5	0.2	0.4	0.3	0.6	1

میسلیوم آن از هموکاریون‌های مادری به راحتی امکان پذیر بود و از محل الحاق میسلیوم‌ها واکشت تهیه گردید و با والدین از نظر رشد رویشی مقایسه شد که مشاهدات نشان داد که هیبرید N1 در محیط کشت CE دارای رشد رویشی مناسب و سرعت رشد بیشتری در مقایسه با دو والد هموکاریون است که می‌تواند تأییدی بر هتروکاریون بودن آن باشد. در ادامه، جهت تأیید مولکولی هیبرید حاصل، واکنش PCR- SSR با استفاده از یک پرایمر (AbSSR 45) انجام گرفت. همانطور که انتظار می‌رفت در هیبرید N1 همانند نمونه شاهد هتروکاریون، دو باند قابل امتیازدهی حاصل شد که نشان‌دهنده وجود دو هسته غیرخواهری در هر واحد سلولی آن می‌باشد (شکل 6-ب).

تلاقی دو هموکاریون نشان‌دهنده این است که این دو میسلیوم دارای تیپ آمیزشی متفاوتی هستند در غیر این صورت امکان تلاقی بین این دو وجود ندارد (45 و 4، 33، 34، 41) پس می‌توان این گونه بیان کرد که نیاز است در مطالعات آینده به جز مطالعات ماتریس شباهت ژنتیکی بین دو هموکاریون، تفاوت یا شباهت تیپ آمیزشی آن دو نیز مورد بررسی قرار گیرد زیرا همانطور که در شکل (6-ج) مشاهده می‌شود تلاقی بعضی از هموکاریون‌های مورد بررسی (که جدا از آزمایش اصلی صورت گرفت) به دلیل شباهت تیپ آمیزشی امکان نداشت.

در مرحله بعد، با توجه به مشخص بودن محل تلاقی و تفاوت واضح سرعت رشد میسلیوم هیبرید N1 در محل الحاق، جداسازی



شکل 6-الف) کشت همزمان و مجاور هم دو هموکاریون با بیشترین فاصله ژنتیکی (4 و 8) در یک پتری جهت تلاقی و گرفتن هیبرید. N1: هیبرید حاصل از تلاقی دو هموکاریون (4 × 8). ب) الگوی باندهای ایجاد شده توسط آغازگر AbSSR 45 بر روی ژل آگارز، ladder: سایزمارکر 100bp plus، M: شاهد هتروکاریون، N1: هیبرید، 4 و 8 نمونه‌های هموکاریون والدی، ج) دو نمونه‌ی ناسازگار تیپ آمیزشی

Figure 6-a) Concurrent culture two homokaryons of *A. bisporus* with the highest genetic distance (4 and 8) in a petri to cross and obtaining the hybrid. N1: Hybrid resulting from a cross between two homokaryon (4 × 8). b) Banding patterns were generated by AbSSR45 primer on agarose gel, ladder: DNA ladder 100bp plus, M: Heterokaryon control, N1: Hybrid, 4, 8: Parental homokaryon samples, c) Two samples with incompatible mating type

منجر به اثبات هتروکاریونی نمونه خواهد شد ولی با عدم مشاهده دو باند در 9 کروموزوم، وجود هتروکاریونی در چهار کروموزوم دیگر همچنان محتمل می‌باشد، اما بر اساس محاسبات انجام شده (3) با

از آنجایی که نشانگرهای SSR مورد بررسی در این تحقیق 9 کروموزوم از 13 کروموزوم هاپلوئیدی این گونه را پوشش می‌دادند (12 و 13)، می‌توان دریافت که مشاهده دو باند در نمونه مورد بررسی

سپاسگزاری

استفاده از نشانگر SSR، می‌توان با احتمال 99/8 درصد نسبت به قطعیت هموکاریون بودن یک نمونه با ده آغازگر موجود دست یافت.

احتراماً از گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- 1- Adams L. S., Chen S., Phung S., Wu X., and Ki L. 2008. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) exhibits antiproliferative and proapoptotic properties and inhibits prostate tumor growth in athymic mice. *Nutrition and Cancer*, 60(6): 744-756.
- 2- Alipoor M., Farsi M., and Mirshamsi Kakhki A. 2014. Improvement of white Button Mushroom Yield by AFLP Marker-assisted Single Spore Selection Method. *Journal of Horticultural Science*, 28(3):327-337. (in Parsian)
- 3- Birati M., Malekzadeh Shafaroudi S., Malekzadeh Kh. and Mirshamsi Kakhki A. 2015. SSR markers for screening and estimating genetic distance of homokaryotic single spores in the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6(4):23-36. (in Parsian with English abstract)
- 4- Callac P., Spataro C., Caille A., and Imbernon M. 2006. Evidence for outcrossing via the Buller phenomenon in a substrate simultaneously inoculated with spores and mycelium of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2366-2372.
- 5- Castle A. J., Horgen P. A., and Anderson J. B. 1987. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4): 816-822.
- 6- Castle A. J., Horgen P. A., and Anderson J. B. 1988. Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens* (*A. bisporus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7): 1643-1648.
- 7- Cullings K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1(4): 233-240.
- 8- De La Bastide P.Y., Sonnenberg A., Van Griensven L.J.L.D., Anderson J.B. and Horgen P.A. 1997. Mitochondrial Haplotype Influences Mycelial Growth of *Agaricus bisporus* Heterokaryons. *Applied and environmental microbiology*, 63(9): 3426-3431.
- 9- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11-15.
- 10- Farsi M., Jalalzadeh B., and Malekzadeh Kh. 2009. The breeding and production of hybrid strains of white button mushroom. *Proceeding of the 6th Iranian Horticultural Science Congress*, 2-15 Jul. 2009, Rasht, and I. R. Iran. (in Parsian)
- 11- Farsi M., and Pourian Far H. 2011. Cultivation and breeding of white button mushroom. *Jahad Daneshgahi Publications*, Mashhad. (in Parsian)
- 12- Foulongne-Oriol M., Spataro C. and Savoie J.-M. 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6): 1125-1135.
- 13- Foulongne-Oriol M., Spataro C., Cathalot V., Monllor S. and Savoie J.-M. 2010. An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* × *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genetics and Biology*, 47(3): 226-236.
- 14- Foulongne-Oriol M., Spataro C., Moinard M., Cabannes D., Callac P. and Savoie J.-M. 2012. Development of polymorphic microsatellite markers issued from pyrosequencing technology for the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. *FEMS Microbiology Letters*, 334(2): 119-126.
- 15- Gordan H.R., Mahmoudnia Meymand M., Zou Alali J., Khatamirad M., and Farsi M. 2008. A study of potential of AFLP markers to genetic fingerprinting of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology)*, 22(1): 27-36. (in Parsian with English abstract)
- 16- Ghorbani Faal P., Farsi M., Pourianfar H.R., Mahmoodnia M. and Zolala J. 2009. Preparation of AFLP Mediated-Molecular Certificate for 12 Bred Strains of the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Plant Protection*, 23(1): 58-67. (in Parsian with English abstract)

- 17- Heath M.C., Li A., Horgen P.A. and Tam P.L. 1995. Hyphal morphology associated with strain instability in the commercial mushroom, *Agaricusbisporus*. Mycologia, pp.442-450.
- 18- Horgen P. and Anderson J. 1992. Biotechnology and edible mushrooms. Biotechnology and Filamentous Fungi, Finklestein, D. and C. Ball (Eds.). Butter Worth, Boston, USA. ISBN, 750691158: 447-462.
- 19- Horgen P. A. and Castle A. 2002. Application and potential of molecular approaches to mushrooms. Agricultural Applications, Springer, 3-17.
- 20- Jolivet S., Arpin N., Wichers H.J. and Pellon G. 1998. *Agaricusbisporus* browning: a review. Mycological Research, 102(12): 1459-1483.
- 21- Kavousi H.R., Farsi M. and Shahriari F. 2008. Comparison of random amplified polymorphic DNA markers and morphological characters in identification of homokaryon isolates of white button mushroom (*Agaricusbisporus*). Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(14): 1771-1778.
- 22- Kerrigan R.W. 1990. Evidence of genetic divergence in two populations of *Agaricusbisporus*. Mycological Research, 94(6): 721-733.
- 23- Kerrigan R.W., Baller L.M., Horgen P.A. and Anderson J.B. 1992. Strategies for the efficient recovery of *Agaricusbisporus* homokaryons. Mycologia, 84(4): 575-579.
- 24- Kerrigan R.W., Royer J.C., Baller L.M., Kohli Y., Horgen P.A. and Anderson J.B. 1993. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricusbisporus*. Genetics, 133(2): 225-236.
- 25- Kerrigan R.W. and Spear M.C., Sylvan Spawn Laboratory Incorporated. 1997. Method for the production of high proportions of homokaryons in breeding stock of the mushroom *Agaricusbisporus*. U.S. Patent NO. 5684228.
- 26- Kerrigan R.W. 2000. A brief history of marker assisted selection in *Agaricusbisporus*. Science and Cultivation of Edible Fungi 2000, 1: 183.
- 27- Li R. and Fang X. 2002. Analysis of POD and EST isozyme of three *Agaricus species*. Edible Fungi of China, 21(4): 34-36.
- 28- Liu M.M., Xing Y.M., Zhang D.W. and Guo S.X. 2015. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in *Polyporus umbellatus* (Polyporales, Basidiomycota). Biochemical Systematics and Ecology, (61): 450-457.
- 29- Ma F.Y. and Luo X.C. 2002. PCR-based restriction analysis of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in the genus.
- 30- Mahmud M. A., Kitaara H., Fukuda M. and Yamada A. 2007. AFLP analysis for examining genetic differences in cultivated strains and their single-spore isolates and for confirming successful crosses in *Agaricus blazei*. Mycoscience, 48(5): 297-304.
- 31- May B. and Royse D. J. 1982. Confirmation of crosses between lines of *Agaricus brunnescens* by isozyme analysis. Experimental Mycology, 6(3): 283-292.
- 32- Miles P.G. and Chang S.T. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. CRC press.
- 33- Miller R. E. 1971. Evidence of sexuality in the cultivated mushroom, *Agaricusbisporus*. Mycologia, 8: 630-634.
- 34- Miller R.E. and Kananen D.L. 1972. Bipolar sexuality in the mushroom. Mushroom Sci, 8: 713-718.
- 35- Moore A., Challen M., Warner P. and Elliott T. 2001. RAPD discrimination of *Agaricusbisporus* mushroom cultivars. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(6): 742-749.
- 36- Mohammadi M., Jahadi M. and Khosravi-Darani K. 2013. *Agaricusbisporus*: Enzymatic browning and its inhibition methods. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 7(4): 63-71. (in Persian with English abstract)
- 37- Murovec J., Stajner N., Jakse J. and Javornik B. 2007. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of *Mimulus* species derived by a cross-genera approach. Journal of the American Society for Horticultural Science, 132(5): 659-663.
- 38- Nazrul M. I., Lin F. X. and Yin-Bing B. 2010. Screening of homokaryotic protoclones of *Agaricusbisporus* (J. Lge) Imbach by colony characters and ISSR markers. Bangladesh Journal of Botany, 39(1): 119-122.
- 39- Nazrul M. I. and Yin-Bing B. 2010. ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricusbisporus*. Current Microbiology, 60(2): 92-98.
- 40- Nazrul M. I. and Yin-Bing B. 2011. Differentiation of homokaryons and heterokaryons of *Agaricusbisporus* with inter-simple sequence repeat markers. Microbiological research, 166(3): 226-236.
- 41- Pandey M. and Tewari R. 1994. Strategies for selection and breeding of edible mushrooms. Advances in Mushrooms Biotechnology. Edited by: MC Nair, C. Gokulapalan and L. Dass. Scientific Publishers, Jodhpur, India: 61-69.

- 42- Ramírez L., Muez V., Alfonso M., Barrenechea A.G., Alfonso L. and Pisabarro A.G. 2001. Use of molecular markers to differentiate between commercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiology Letters, 198(1): 45-48.
- 43- Raper C. A., Raper J. R. and Miller R. E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia, 1088-1117.
- 44- Richard G.F., Hennequin C., Thierry A. and Dujon B. 1999. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. Research in Microbiology, 150(9): 589-602.
- 45- Roupas P., Keogh J., Noakes M., Margetts C. and Taylor P. 2012. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. Journal of Functional Foods, 4(4): 687-709.
- 46- Royse D.J. and May B. 1982. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. Mycologia, 93-102.
- 47- Sánchez-Pérez R., Ruiz D., Dicenta F., Egea J. and Martínez-Gómez P. 2005. Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. Scientia Horticulturae, 103(3): 305-315.
- 48- Savoie J. M., Minvielle N. and Largeteau M. L. 2008. Radical scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(6): 970-975.
- 49- Selkoe K.A. and Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9(5): 615-629.
- 50- Shehata A.I., Al-Ghethar H.A. and Al-Homaidan A.A. 2009. Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines. Saudi Journal of Biological Sciences, 16(2): 57-62.
- 51- Singer R. and Harris B. 1987. Mushrooms and truffles. Koeltz Scientific Books. Germany. 389pp.
- 52- Soltis Lab CTAB DNA extraction protocol. 2002. The Soltis Lab, Florida Museum of Natural History, on line at: <http://www.flmnh.ufl.edu/soltislab>
- 53- Song S., Su W., Zeng W. and Wang Z. 2000. RAPD analysis of species diversity and genomic differences in *Agaricus bisporus*. Science and Cultivation of Edible Fungi 2000, 1: 191.
- 54- Sonnenberg A. S. M., Johan J. P. B., Hendrickx P. M., Lavrijssen B., Wei G., Weijn A., Mes J. J., Savoie J. M., Foulongne-Oriol M., Largeteau M. and Barroso G. 2011. Breeding and strain protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. In Mushroom biology and mushroom products. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 4-7 October.
- 55- Terashima K. and Matsumoto T. 2004. Strain typing of shiitake (*Lentinula edodes*) cultivars by AFLP analysis, focusing on a heat-dried fruiting body. Mycoscience, 45(1): 79-82.
- 56- Wang Y., Chen M., Wang H., Wang J.-F. and Bao D. 2014. Microsatellites in the Genome of the Edible Mushroom, *Volvariella volvacea*. Biomed Research International 2014.
- 57- Xiao Y., Liu W., Dai Y., Fu C. and Bian Y. 2010. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes*' natural germplasm in China. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(3): 527-536.
- 58- Yan P.-S. and Jiang J.-H. 2005. Preliminary research of the RAPD molecular marker-assisted breeding of the edible basidiomycete *Stropharia rugoso-annulata*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(4): 559-563.
- 59- Zhang R., Hu D., Zhang J., Zuo X., Jiang R., Wang H. and Ng T.B. 2010. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 110(3): 273-275.
- 60- Zhao J. and Chang S.T. 1993. Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9(5): 538-543.



Screening of the White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Homokaryons and Producing New Hybrid Strain by SSR Markers

S. M. Nourashrafedin¹ - M. Farsi^{2*} - F. Shahriari² - J. Janpoor³

Received: 22-05-2017

Accepted: 23-07-2017

Introduction: Edible white button mushroom (*Agaricus bisporus*) is the most common edible mushroom in Iran and the world. The yield of this mushroom is less than the average of yield in the world because of strain degeneration and using strains with low yield. Most of the current hybrids are either identical or very similar to the first hybrids. Ongoing breeding programs are exploiting the variability in *Agaricus* germplasm to produce new varieties with better traits including higher yield and resistance to biotic and abiotic stresses. One of the breeding programs is F₁ production from parental homokaryons crossing. These homokaryons were isolated among germinated basidiospores on the culture media. During the last decades, various molecular markers based on nucleic acid polymorphisms (such as Restriction Fragment Length Polymorphism, Random Amplification of Polymorphic DNA, Amplified fragment of Length Polymorphism, Inter Simple Sequence Repeat, Simple Sequence Repeat markers) have been used to differentiate homokaryons and heterokaryons. Microsatellites consist of short tandem repeat motifs distributed throughout the genome. Microsatellites are usually highly polymorphic due to a high degree of variation in the number of repeats among individuals. Microsatellite markers are multiallelic and co-dominant and thus tend to be more informative than other marker systems. Microsatellite markers have been widely developed in animals and plants and more recently in fungal species. The presence of microsatellites in the genome of *A. bisporus* was previously reported.

Materials and Methods: In this research, 160 germinated basidiospores were collected from commercially cultivated strain A15 and they were grown on compost extract agar (CEA). The mycelial growth rate of these 160 isolates was evaluated at 25°C on CEA medium. 18 isolates with slow growing rate were selected from 160 isolates. In the next step, co-dominant SSR markers were used to homokaryons detection. Ten SSR primers showed polymorphism in parental control samples that were used to this experiment. The isolates were divided into two general homoallelic and heteroallelic groups and seven isolates from homoallelic group, which showed one-band pattern, characterized as putative homokaryon. Genetic similarity was calculated by NTSYSpc software version 2.02 e using UPGMA method. In the next step of experiment, the isolates (4 and 8) had minimum genetic similarity that was crossed to produce hybrid. In order to confirm the hybrid formation, PCR-SSR reaction with a primer (AbSSR 45) was performed.

Results and Discussions: Basidiospores were collected and allowed to germinate on CEA medium. Putative homokaryons were different in colony morphology and growth rate compared to the original heterokaryons. Mycelium samples showed different colony morphology including tomentose, appressed and strandy mycelium. Different growth rate can be affected by genetic factors in nucleus and mitochondria. After four weeks, mycelium browning was appeared in liquid compost extract medium and created a disturbance in DNA extraction. To solve this problem, DNA was extracted from three-week old mycelium. Mycelium browning may cause by phenolic compounds produced by mycelium and enzymes that catalyze melanin biosynthesis reactions. Ten primers were used to homokaryon isolation. These primers were situated on the 9 linkage groups of 13 haploid chromosomes. Seven isolates were distinguished as putative homokaryon that showed one-band in all primers on the gel electrophoresis. The results of genetic similarity calculation showed that this index was variable between 0.17 to 0.67 in 7 homokaryon isolates and the minimum genetic similarity (0.17) was observed between isolates 4 and 8. These two isolates were crossed and the result of this crossing was N1 hybrid. Also, other homokaryon isolates were crossed and mating incompatibility was observed in some of them. According to these observations, it is suggested that in future studies, in addition to genetic similarity, sexual incompatibility should also be considered. Hybrid N1 produced aerial mycelium and had higher growth rate in comparison to

1, 2 and 3- PhD Student and Professors, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(*- Corresponding author Email: Farsi@um.ac.ir)

4-Department of Industrial Fungal Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad branch, Iran

parental homokaryons and similar to heterokaryon control, had two-bands pattern. This two bands pattern indicates the presence of two non-sister nucleuse in each cells. Finally, the results showed that SSR marker can result to accurate detection of homokaryons.

Conclusions: The aim of the present study was screening homokaryon isolates of *A.bisporus* using SSR markers to obtain hybrid. Results showed that growth rate of homokaryon isolates were lower than the heterokaryons. Since, SSR markers were able to show high polymorphism in the isolates, thus it can be said that these markers are suitable to homokaryon screening. Final result of this study is N1 hybrid that can compare to commercially cultivated strains.

Keywords: Genetic variation, Morphological variation, Heterokaryon and Codominant marker

Contents

Evaluation of Genetic Diversity in Collection from Iranian Jujube Ecotypes (<i>Ziziphus</i> spp.) using ISSR-molecular Marker	437
H. Shayesteh - S. Malekzadeh Shafaroudi - K. Ghouth - F. Shahriari	
Optimization of Factors Affecting in vitro Propagation of ‘Myrobalan 9c’ Rootstock	447
Z. Shabani - B. Abedi - E. Ganjimoghadam - A. Tehranifar	
Assessment of Summe Savory (<i>satureja hortensis</i> L.) Biomass by Easily-Attainable Soil Parameters and Artificial Network	456
H. Sabourifard - A. Ghasemnezhad- Kh. Hemmati- A. Hezarjeribi, M.R. Bahrami- F. Nosrati	
Effects of Cow Manure, Ammonium Sulfate and Potassium Sulfate on Physico-Chemical Indices of Fruit and Leaf of Mazafati Date (<i>Phoenix Dactylifera</i> L.)	468
E. Aryakia - H.R. Roosta- N. Rahmizade	
Effect of Plant Growth Regulators on Callogenesis and Regeneration Of <i>Fritillaria imperialis</i> L.	482
Es. Chamani - M. Ghamari- M. Mohebodini- A.R. Ghanbari- H.R. Heydari	
Determining Appropriate Harvesting Date and Storage Life of Kinnow Mandarin Fruits in Jiroft County	491
S. M. Miri - M. Salari - A. Ahmadpour	
Effect of Nitric Oxide Application on Reduction of Undesirable Effects of Chilling on Washington Navel orange (<i>Citrus sinensis</i> L.) Fruit During Storage	504
B. Ghorbani - Z. Pakkish	
The Effect of Cadmium, Zinc and Zeolite Application on Physiomorphological Characteristics of St. John’s Wort (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	516
Zh. Zandavifard - M. Azizi- H. Aroiee- A. Fotovvat	
Effect of Salicylic Acid on Prevention of Chilling Injury of Cherry Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Messina)	532
H. Seyed Hajizadeh - Sh. Safkhani	
The Effect of Planting Date on Yield and Nitrate Accumulation in Spinach (<i>Spinacia oleracea</i> L.) in Esfahan Weather Conditions	542
P. Jafari - A. Jalali	
Effect of Different Plastic mulch on Growth and Yield of Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)	554
Kh. Parvizi - M.R. Hassandokht - B. Azad	
Effect of Cultivar and Plant Growth Regulators on Invitro Regeneration of <i>Lilium</i> Spp. Utilizing Thin Cell Layer Explants	564
A. Sharifi - F. Keykha Akhar- M. Yazdi- A. Bagheri	
The Effect of Forchlorfenuron on Bulblet Formation, Antioxidant Characteristics and Phytochemicals Compounds of Persian Shallot (<i>Allium hirtifolium</i>)	576
N. Farhadi - S. Alizadeh Salteh	
Effect of Foliar Spray of Some Micronutrient Elements before and after Flowering on Quantitative and Qualitative Characteristics of Table Grape cv. Khoshnaw	589
Z. Davarkhah- B. Kavosi	
The Effect of Water Deficit Different Levels on Antioxidant System and Lipid Peroxidation in two Species <i>Tagetes erecta</i> and <i>Tagetes patula</i> of Marigold	598
S. M. Mousavi - M. Chehrazhi - E. Khaleghi	
Determination of Cardinal Temperatures for Cool Season Turfgrass and Two Common Weed Species	610
M. Diyanat	
Study of Genetic Diversity of Some Persian walnut Genotypes in Mashhad Commercial Orchards by using ISSR Marker	620
Sh. Attar- Gh. Davarynejad- L. Samiee- M. Moghadam	

Screening of the White Button Mushroom (*Agaricusbisporus*) Homokaryons and Producing New Hybrid Strain by SSR Markers 633

S. M. Nourashrafedin - M. Farsi- F. Shahriari- J. Janpoor

HORTICULTURAL SCIENCES

(AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY)

Vol. 31 No. 3 2017

Published by: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Editor in charge: Valizadeh,R.(Ruminant Nutrition) Prof. Ferdowsi University of Mashhad.

General Chief Editor: Tehranifar,A. (Horticultural Sciences) Prof. Ferdowsi University of Mashhad.

Editorial Board:

TehraniFar,A.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Davarynejad, GH.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Talaie, A.	Pomologist	Prof. Tehran University.
Azizi, M.	Medicinal Plants	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Ebadi,A.	Horticultural Sciences	Prof .Tehran University.
Farsi, M.	Plant Breeding and Genetics	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Kafi, M.	Floriculture and landscaping	Prof .Tehran University.
Lahouti, M.	Biology	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Mobli,M.	Horticultural Sciences	Prof. Isfahan University of Technology.

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad.

Printed by: Ferdowsi University of Mashhad, press.

Address: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

P.O.BOX: 91775- 1163

Tel: +98-0511- 8795620

Fax: +98-0511- 8787430

E-Mail: Jhorts4@um.ac.ir

Web Site: <http://jm.um.ac.ir>