

عنوان مقالات

- مطالعه اثر بسترهای آبی کشت بر اجزای عملکرد و کیفیت و کمیت اسانس در چند اکوتیپ مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.) در شرایط آب و هوایی گرگان..... ۳۴۹
خدایار همتی - بختیار اردوانپور - مینا غزاییان - وحید اکبرپور
- بررسی پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیک توده‌های بومی علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.) در شرایط تنش خشکی و شوری..... ۳۶۳
محمد حسین شیخ محمدی - نعمت الله اعتمادی - علی نیکبخت - مصطفی عرب - محمد مهدی مجیدی
- بررسی اثر تیمار گرمایی و قارچ کش بر کنترل آلودگی کشت درون شیشه‌ای سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.)..... ۳۷۷
سیده مهدیه خرازی - علی تهرانی فر - احمد شریفی
- ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد کمی و کیفی گاو زبان ایرانی (*Echium amoenum*) تحت تأثیر تراکم گیاهی و کاربرد کود شیمیایی اوره و کودهای آلی مختلف..... ۳۸۷
محمد بهزاد امیری - پرویز رضوانی مقدم - محسن جهان
- بیهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی در گیاه زیتنی زامیفولیا (*Zamioculcas zamiifolia*)..... ۴۰۵
مهناز صیادی نژاد - سید مصطفی صادقی
- تأثیر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر صفات مورفوفیزیولوژیک و عناصر برگ گیاه پرپوش تحت تنش خشکی..... ۴۱۷
محترم عباسپور اسفند - سیده کلاته جاری - فواد فاتحی
- مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی هفت جمعیت گیاه دارویی پای خر (*Tussilago farfara* L.) کشت شده در شرایط آب و هوایی تهران..... ۴۳۳
محمد نورانی یزن آباد - محمدتقی عبادی - مهدی عیاری نوش آبادی
- تأثیر تنش‌های خشکی و شوری بر رشد، گلدهی و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نرگس (*Narsicuss tazetta* L.)..... ۴۵۱
علی ناصری مقدم - حسن بیات - محمد حسین امینی فرد - فرید مرادی نژاد
- بررسی تأثیر محیط کشت‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کشت تک گره گیاه پپینو (*Solanum muricatum* Aiton) در شرایط کشت بافت..... ۴۶۷
مانده عقدایی - سید حسین نعمتی - لیلا سمیعی - احمد شریفی شریف آباد
- بررسی تنوع ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی، و تجزیه علیت عملکرد سوخ و میزان آلئوسین توده‌های محلی سیر ایرانی در منطقه همدان..... ۴۸۱
محمد حسین عالم خورام - امیرحسین کشت‌کار - اصغر میرزایی اصل
- بررسی کارآیی تیمارهای تلفیقی گرمادرمایی و کشت مرستم‌انتهایی بر تولید نهال عاری از سه ویروس آلوده‌کننده سیب "گوشت سرخ" (*Malus pumila* Mill.) در شرایط درون شیشه‌ای..... ۴۹۹
نوشین کاظمی - علی اکبر حبشی - وهب اسدی
- اثر غنچه‌گیری، محلول‌پاشی نیتروژن و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات رویشی و زایشی گل جعفری..... ۵۱۰
محبوبه زمانی پور

ادامه فهرست داخل جلد

Contents

- Study of Different Organic Media on Yield Components, Quality and Quantity of Essential Oil of some Savory (*Satureja hortensis* L.) ecotypes in Gorgan 361
Kh. Hemmati- B. Ardavanpour- M. Ghazaeian- V. Akbarpour
- Study of Morphophysiological Responses of Iranian Crested Wheatgrass Genotypes (*Agropyron cristatum* L.) under Drought and Salinity Stresses 375
M.H. Sheikh Mohammadi- N. Etemadi- A. Nikbakht- M. Arab- M.M. Majidi
- The Effect of Heat Treatment and Fungicide on Controlling the Infestation of *Narcissus tazetta* L. In Vitro Culture..... 386
M. Kharrazi- A. Tehranifar- A. Sharifi
- Evaluation of Morphological Characteristics, Quantitative and Qualitative Yield of *Echium amoenum* as Affected by Plant Density and Application of Chemical (Urea) Fertilizer and Different Organic Fertilizers 403
M.B. Amiri- P. Rezvani Moghaddam- M. Jahan
- Optimization of Callus Production and Regeneration of *Zamiifolia* (*Zamioculcas zamiifolia*) 416
M. Sayadi Nejad- S.M. Sadeghi
- The Effect of Salicylic Acid and L-arginine on Morpho-physiological Properties and Leaf Nutrients of *Catharanthus roseus* under Drought Stress 432
M. Abaspour Esfaden- S. Kallaterjari- F. Fatehi
- Cultivation and Comparing Morphological and Phytochemical Characteristics of Seven Population of *Tussilago farfara* L. in Tehran Climate Conditions..... 449
M. Norani- M.T. Ebadi- M. Ayyari Noushabadi
- Effect of Drought and Salinity Stress on Growth, Flowering and Biochemical Characteristics of *Narsicuss tazetta* L. 466
A. Naseri Moghadam- H. Bayat- M.H. Aminifard- F. Moradinezhad
- Effect of Medium and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) in Vitro Condition..... 479
M. Aghdaei- S.H. Nemati- L. Samiei- A. Sharifi
- Study of Agromorphological Diversity, and Path Analysis of Bulb Yield and Allicin Content of Iranian Garlic Landraces under Hamedan Region 498
M.H. Alemkhoumaram- A.H. Keshtkar- A. Mirzaie Asl
- Culture Efficiency on Virus Elimination from *in Vitro* Shootlets of Red Flesh Apple (*Malus pumila* Mill.)..... 509
N. Kazemi - A.A. Habashi- W. Asadi
- Effect of Pinching, Spraying of Nitrogen and Plant Growth Regulators on Vegetative and Reproductive Characteristics of African Marigold 523
M. Zamanipour

Continue Content in cover

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

پاییز 1398

شماره 3

جلد 33

بر اساس مصوبه وزارت عتف از سال 1398، کلیه نشریات دارای درجه "علمی-پژوهشی" به نشریه "علمی" تغییر نام یافتند.

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد
مدیر مسئول: رضا ولی زاده
سر دبیر: علی تهرانی فر
اعضای هیئت تحریریه:

استاد - تغذیه نشخوارکنندگان (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
دانشیار - علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - فیزیولوژی بذر (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
دانشیار - علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
دانشیار - علوم باغبانی (دانشگاه صنعتی اصفهان)
پژوهشگر - موسسه کشاورزی و غذا اوتاوا کانادا
استاد - علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه شیراز)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
دانشیار - علوم باغبانی (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)
استاد - گیاهان دارویی (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
استاد - گروه علوم باغبانی دانشگاه آیداهو آمریکا
استاد - ژنتیک و اصلاح نباتات (دانشگاه فردوسی مشهد)
استاد - گلکاری و مهندسی فضای سبز (دانشگاه تهران)
استاد - فیزیولوژی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)
چاپ: چاپخانه دانشگاه فردوسی مشهد

آرویی، حسین
توکل افشاری، رضا
تهرانی فر، علی
شور، محمود
حقیقی، مریم
خانی زاده، شاهرخ
داوری نژاد، غلامحسین
راحمی، مجید
زمانی، ذبیح اله
شریفانی، محمد مهدی
عزیزی، مجید
عبادی، علی
فلاحی، اسماعیل
فارسی، محمد
کافی، محسن
لاهوئی، مهرداد
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 صورت فصلنامه (4 شماره در سال) چاپ و منتشر می شود.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

- 349 مطالعه اثر بسترهای آلی کشت بر اجزای عملکرد و کیفیت و کمیت اسانس در چند اکوتیپ مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.) در شرایط آب و هوایی گرگان
خداپار همتی - بختیار اردوان پور - مینا غزاییان - وحید اکبرپور
- 363 بررسی پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیک توده‌های بومی علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.) در شرایط تنش خشکی و شوری
محمد حسین شیخ محمدی - نعمت الله اعتمادی - علی نیکبخت - مصطفی عرب - محمد مهدی مجیدی
- 377 بررسی اثر تیمار گرمائی و قارچ کش بر کنترل آلودگی کشت درون شیشه‌ای سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.)
سیده مهدیه خرازی - علی تهرانی فر - احمد شریفی
- 387 ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد کمی و کیفی گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) تحت تأثیر تراکم گیاهی و کاربرد کود شیمیایی اوره و کودهای آلی مختلف
محمد بهزاد امیری - پرویز رضوانی مقدم - محسن جهان
- 405 بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی در گیاه زینتی زامیفولیا (*Zamioculcas zamiifolia*)
مهناز صیادی نژاد - سید مصطفی صادقی
- 417 تأثیر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر صفات مورفوفیزیولوژیک و عناصر برگ گیاه پرپوش تحت تنش خشکی
محترم عباسپور اسفدن - سپیده کلاته جاری - فواد فاتحی
- 433 مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی هفت جمعیت گیاه دارویی پای خر (*Tussilago farfara* L.) کشت شده در شرایط آب و هوایی تهران
محمد نورانی یزن آباد - محمدتقی عبادی - مهدی عیاری نوش آبادی
- 451 تأثیر تنش‌های خشکی و شوری بر رشد، گلدهی و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نرگس (*Narsicuss tazetta* L.)
علی ناصری مقدم - حسن بیات - محمد حسین امینی فرد - فرید مرادی نژاد
- 467 بررسی تأثیر محیط کشت‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کشت تک گره گیاه پپینو (*Solanum muricatum* Aiton) در شرایط کشت بافت
مائده عقدایی - سید حسین نعمتی - لیلا سمیعی - احمد شریفی شریف آباد
- 481 بررسی تنوع ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی، و تجزیه علیت عملکرد سوخ و میزان آلئوسین توده‌های محلی سیر ایرانی در منطقه همدان
محمد حسین عالم خورام - امیرحسین کشت‌کار - اصغر میرزایی اصل
- 499 بررسی کارآیی تیمارهای تلفیقی گرمادرمانی و کشت مریستم انتهایی بر تولید نهال عاری از سه ویروس آلوده کننده سبب "گوشت سرخ" (*Malus pumila* Mill.) در شرایط درون شیشه‌ای
نوشین کاظمی - علی اکبر حبشی - وهب اسدی
- 510 اثر غنچه‌گیری، محلول‌پاشی نیتروژن و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات رویشی و زایشی گل جعفری
محبوبه زمانی پور
- 525 نقش اکوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کشت تعلیقی سلولی چویل (*Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss.)
سید مهران علوی - اسد معصومی اصل - ناصر زارع - رسول اصغری زکریا - پریسا شیخ زاده مصدق

539 اثر طیف‌های نور ال‌ای‌دی در مقایسه با نور طبیعی گلخانه بر کیفیت نشاء حسن یوسف (*Solenostemon escutellariodes*)
'Wizard Scarlet' و اطلسی (*Petunia × hybrida* 'Scarlet Eye'

پریا دهخدايي - سعيد ريزي - مسعود قاسمي قهساره

551 تأثیر تنش شوری درون شیشه‌ای بر شاخص‌های رشدی، محافظت اسمزی و تنش اکسیداتیو در پینه گیاه قرنفل
عابدین مشعشی - محمدمهدی جوکار



مطالعه اثر بسترهای آلی کشت بر اجزای عملکرد و کیفیت و کمیت اسانس در چند اکوتیپ مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.) در شرایط آب و هوایی گرگان

خدایار همتی^۱ - بختیار اردوانپور^۲ - مینا غزاییان^۳ - وحید اکبرپور^{۴*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

مرزه (*Satureja hortensis* L.) گیاهی است از خانواده نعنائیان که اسانس آن در صنایع دارویی و آرایشی و غذایی کاربرد زیادی دارد. هدف از این تحقیق مطالعه اثرات چند نوع بستر کشت آلی شامل: ۱- خاک مزرعه (شاهد)، ۲- کود دامی، ۳- کمپوست زباله شهری، ۴- خاکبرگ، ۵- مخلوط بسترها به نسبت مساوی بر روی خصوصیات رویشی و زایشی و نیز کمیت و کیفیت اسانس در سه اکوتیپ مرزه تابستانه (گردستان، شیراز و یزد) بود. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی شماره یک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. اکوتیپ شیراز دارای بیشترین درصد اسانس (۱/۲ درصد) در بین اکوتیپ‌های مختلف بود، ولی بین تیمارهای مختلف و بین اکوتیپ‌ها تفاوت معنی داری نشان نداد. اثر تیمارها بر روی اجزای اسانس شامل کارواکرول، گاماترپین و پاراسیمین معنی دار بود. اسانس گیاهان در بستر مخلوط بیشترین میزان کارواکرول (۷۴/۶۹ درصد) را داشت. اکوتیپ یزد در بین اکوتیپ‌ها بیشترین میزان کارواکرول را نشان داد. در میان بسترهای کشت، تیمار شاهد بیشترین درصد گاماترپین (۵/۴۸ درصد) و بیشترین درصد پاراسیمین (۱/۷۶) را داشت و همه بسترهای آلی باعث کاهش معنی دار این ترکیب‌ها در اسانس شدند. همچنین در مقایسه اکوتیپ‌های مختلف، اکوتیپ شیراز دارای بیشترین میزان گاماترپین و اکوتیپ گردستان بیشترین درصد پاراسیمین (۱/۶۹) بودند. با توجه به نتایج حاصله و اینکه اختلافی بین مصرف انواع کودهای آلی از لحاظ اجزای عملکرد و درصد اسانس مرزه مشاهده نشد، بنابراین در صورتی که هر یک از انواع کودهای آلی مورد استفاده در این آزمایش در دسترس بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه‌تر باشد، قابل توصیه برای کشاورزان و تولیدکنندگان گیاه دارویی مرزه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، کیفیت اسانس، کود دامی، کارواکرول

مقدمه

اسانس مرزه تابستانه بستگی به بیوماس اندام‌های هوایی دارد، اجزای عمده تشکیل دهنده اسانس آن کارواکرول، پاراسیمین و گاماترپین می‌باشد (۳۳ و ۳۴). مقدار اسانس آن بسته به شرایط محیطی محل رویش بین ۱ تا ۲ درصد متغیر می‌باشد. کارواکرول یکی از مهمترین اجزا و تعیین کننده کیفیت اسانس مرزه بوده و بسته به شرایط ۳۵ تا ۸۵ درصد اسانس را تشکیل می‌دهد (۱۱، ۱۴ و ۳۶). برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی، ارقام همگن با درصد بالای ماده موثره و عملکرد بالای اندام دارویی مورد نیاز می‌باشد. از طرفی، لازمه عرضه گیاهان دارویی، عاری بودن آن‌ها از بقایای مواد شیمیایی است. بنابراین، می‌توان از گزینه‌های جایگزین کودهای شیمیایی، مانند انواع کودهای آلی از جمله کودهای حیوانی و گیاهی استفاده نمود (۲۳). کودهای دامی، بقایای مواد غذایی، گیاهی و تولیدات دیگری که اغلب به عنوان ضایعات در نظر گرفته می‌شوند در مزارع زیستی به عنوان منابع غذایی و مواد آلی ارزش پیدا می‌کنند و کشاورزان زیستی با

مرزه تابستانه (*Satureja hortensis* L.) گیاهی از خانواده نعنائیان که منشأ آن مناطق مدیترانه‌ای بوده و در اکثر فارماکوپه‌ها به عنوان گیاه دارویی شناخته شده است (۸). تیره نعناع حدود ۳۰ گونه داشته که ۱۲ گونه از این جنس در ایران وجود داشته و حدود ۸ گونه آن بومی و منحصر به کشور ایران می‌باشد (۷، ۲۸). قسمت‌های هوایی گیاه دارای اسانس و ترکیبات فنولی می‌باشد (۴، ۳۸). عملکرد

۱ و ۲- به ترتیب دانشیار و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی،

دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان

۴- استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(*)- نویسنده مسئول: (Email: v_akbarpour60@yahoo.com)

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.34301

امروزه با توجه به اهمیت کشاورزی ارگانیک و نقش آن در سلامتی بشر و نیز مسایل زیست محیطی مرتبط با کاربرد بی رویه کودهای شیمیایی و در راستای توسعه کاربردی روش های تولید محصول سالم، تحقیق حاضر جهت مطالعه اثر بسترهای مختلف کشت آلی بر روی عملکرد و اجزای آن و نیز کمیت و کیفیت اسانس در گیاه مرزه تابستانه در شرایط آب و هوایی استان گلستان طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها

به منظور بررسی اثر بسترهای آلی کشت بر کمیت و کیفیت برخی اکوتیپ های مرزه، آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک های کامل تصادفی در چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی شماره یک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (طول جغرافیایی $54^{\circ}19'$ ، عرض جغرافیایی $36^{\circ}49'$ و ارتفاع ۸۴ متر از سطح دریا) انجام گردید. تیمار های مورد استفاده در این طرح عبارت بودند از: ۱- خاک مزرعه (شاهد)، ۲- کود دامی کاملاً پوسیده (سه ساله)، ۳- کمپوست زباله شهری، ۴- خاکبرگ (برگ درختان جنگلی شامل: بلوط، ممرز و انجیلی با درجه پوسیدگی یکساله)، ۵- مخلوط (کود دامی، کمپوست زباله شهری و خاکبرگ: به نسبت مساوی) به عنوان فاکتور اصلی و سه اکوتیپ مرزه تابستانه شامل اکوتیپ های کردستان، شیراز و یزد به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شدند. آماده سازی زمین جهت اجرای طرح در بهار و با انجام عملیات شخم و دیسک زنی صورت گرفته و سپس کرت بندی انجام شد. ابعاد کرت ها 4×2 متر و به فاصله ۱ متر از هم در نظر گرفته شد. پس از افزودن کودهای آلی (کود دامی، کمپوست زباله شهری و خاکبرگ) یکبار دیگر به منظور مخلوط شدن آن ها با خاک، زمین با بیل شخم زده شد. میزان کود برابر ۴۰ تن در هکتار در نظر گرفته شد و در هر کرت ۳۲ کیلوگرم کود مصرف گردید. کمپوست زباله شهری ابتدا آبشویی سپس به مخلوط خاکی افزوده شد. کودهای آلی مذکور قبل از کاشت نشاهای مرزه در دهه آخر بهمن ماه در شرایط آب و هوایی گرگان بر اساس طرح آماری به خاک افزوده شدند.

بذور سه اکوتیپ مرزه تابستانه شامل اکوتیپ کردستان، شیراز و یزد از مراکز تحقیقات کشاورزی استان های مذکور تهیه شد. بذور پس از مخلوط کردن با ماسه بادی (به دلیل ریز بودن)، به صورت ردیفی (فاصله ردیف ها از هم ۴۰ سانتی متر) در اردیبهشت ماه کاشته شدند و بلافاصله آبیاری شدند. گیاهان در مرحله چهار برگی تنک شدند، به طوری که فاصله گیاهان از هم روی ردیف ها ۲۵ سانتی متر بود. بیست روز پس از کاشت، وجین دستی نوبت اول انجام شد. نوبت دوم وجین دستی نیز ۲۰ روز پس از نوبت اول انجام شد. مراحل دیگر وجین بسته به میزان رشد علف های هرز صورت گرفت. دیگر عملیات داشت

باز یافت مواد زاید مقدار ضایعات را کاهش می دهند (۲۱ و ۲۴). افزودن ترکیبات ارگانیک مختلف به خاک باعث پیشرفت مشخصی در عملکرد، رشد و ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی و معطر مانند رزماری (۱۸)، گیاه دارویی و زینتی جعفری (۱۹) و مرزه (۳۰) گردید. طی آزمایشی انجام شده توسط میشل و همکاران (۲۵) روی گوجه فرنگی مشخص شد که گیاهان کشت شده به صورت ارگانیک حاوی سطوح بالاتری از فلاونوئیدهای کریستین و کامفرول اگلیکون بود. ادريس و همکاران (۸) در بررسی مقایسه ای کودهای آلی با کودهای شیمیایی بر برخی صفات گیاه دارویی *Origanum majorana*، وزن تر، وزن خشک، ارتفاع گیاه، قطر ساقه، تعداد شاخساره و درصد اسانس نشان دادند که تیمار کود آلی به طور معنی داری بالاتر از کود شیمیایی بود. در تحقیق مکی زاده و همکاران (۲۷) بر روی اثر کاربرد منابع مختلف کود ازته بر عملکرد کمی و کیفی گیاه مرزه، بالاترین عملکرد اسانس مربوط به تلفیق کود زیستی و ۵۰ درصد کود شیمیایی (۳۰/۲۳ کیلوگرم در هکتار) بود و پس از آن به ترتیب کود شیمیایی (اوره) و کود زیستی (ترکیبی از باکتری های ازتوباکتر و آزوسپریلیوم) بیشترین میزان اسانس را تولید نمودند.

عملکرد، میزان و کیفیت مواد ثانویه یک گیاه در رویشگاه ها و مناطق مختلف تغییر می یابد. دلیل این امر نوسان فعالیت های متابولیکی گیاه تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی است. اکوتیپ های یک گونه گیاهی ممکن است از لحاظ نحوه زادآوری، زمان گلدهی، مقاومت به سرما و امثال آن با یکدیگر تفاوت داشته باشند (۱۱). هادیان (۱۴) در مطالعه ای اکوتیپ های مختلف مرزه تابستانه را از لحاظ صفات مورفولوژیکی و اجزای عملکرد مورد بررسی قرار داد و گزارش کرد که بیشترین میزان وزن تر متعلق به توده اصفهان و کمترین وزن تر متعلق به توده اراک می باشد، بیشترین و کمترین میزان وزن خشک نیز در همین توده ها مشاهده شد. بیشترین عملکرد اندام حاوی اسانس در توده اصفهان و مراغه به ترتیب ۵۳ و ۴۱ گرم مشاهده شد. همچنین نتایج بررسی صفات فیتوشیمیایی بین توده ها نشان داد که تنوع قابل توجهی وجود داشته و میانگین بازده اسانس توده های مختلف بین ۰/۵۷ و ۲/۹ درصد متنوع بود. کمترین در توده ارومیه و بیشترین متعلق به توده اهواز بود. همچنین توده های اراک، نیشابور، مریوان و اهواز به ترتیب با میزان کارواکرول ۸۳/۳، ۸۳/۳، ۷۶/۹ و ۶۷ درصد در گروه توده های غنی از کارواکرول قرار گرفتند (۱۵). همچنین در آزمایشی دیگر به منظور مقایسه توده های ژنتیکی مرزه سهندی در شرایط کشت شده جهت تعیین درصد و شناسایی ترکیبات اسانس مشخص شد که نمونه های برداشت شده طی چین های مختلف در بین اکوتیپ های مختلف روند یکسانی نداشته و میزان تیمول، پاراسیم و گاماترپین در میان اکوتیپ ها متفاوت بودند (۲).

مرحله تمام گل بودند (۱۷). در منطقه گرگان برداشت در اواخر تیرماه انجام شد. ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن تر و وزن خشک ساقه و ریشه و تعداد برگ اندازه‌گیری شد. برای ثبت داده‌های مربوط به این فاکتورها، از هر تیمار ۱۰ بوته به طور تصادفی برداشت شده و میانگین آن‌ها به عنوان داده نهایی ثبت شد. به منظور تعیین وزن تر و وزن خشک از ترازوی دیجیتالی ۰/۰۰۱ استفاده شد و برای خشک کردن نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری وزن خشک آن‌ها از دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. صفات ظاهری از جمله تعداد گل در بوته و قطر گل در زمان اوج گلدهی و تعداد بذر در بوته و وزن هزار دانه بذر پس از رسیدن کامل بذرها توزین و ثبت شد. فاکتور قطر گل با استفاده از کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد و برای هر کدام از صفات، میانگین ۱۰ بوته به عنوان داده نهایی ثبت شد. نمونه‌های تهیه شده با دستگاه آسیاب برقی خرد شد. اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر انجام شد (۳۲). به منظور تعیین مقدار سه ترکیب اصلی اسانس (کارواکرول، گاماترپین و پاراسیمین) از دستگاه کروماتوگرافی گازی FID استفاده شد. استاندارد سه ترکیب مذکور از شرکت مرک آلمان تهیه شد، سپس نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های اسانس در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) به دستگاه تزریق شدند. میزان ترکیبات مذکور در نمونه‌های اسانس توسط نرم‌افزار دستگاه با استفاده از سطح زیر پیک استانداردها و نمونه‌های اصلی محاسبه و برآورد شد. تجزیه آماری داده‌ها به کمک نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

از جمله سله‌شکنی و آبیاری به موقع (با توجه به شرایط مزرعه و میزان نزولات جوی صورت گرفت، زیرا به عنوان تیمار نبوده است) انجام شد و در طول دوره انجام آزمایش از مصرف آفت‌کش و قارچ‌کش خودداری گردید. برای جلوگیری از شسته شدن بذور در مراحل اولیه دوره آزمایش (تا یک ماه پس از کاشت) از آبیاری بارانی استفاده شد و پس از گذشت یک ماه تا زمان برداشت گیاهان، آبیاری به صورت کرتی انجام شد.

جدول ۱- نتایج تجزیه خاک مزرعه مورد استفاده در آزمایش

Table 1- Farm soil analysis data	
pH	7.2
EC (ds/m)	1.02
ازت کل N (%)	0.059
پتاسیم قابل جذب K (mg/kg)	276
فسفر قابل جذب P (PPM)	11.7
کلسیم محلول Ca (meq/l)	3.7
مواد آلی Organic matter(%)	0.72
عمق نمونه‌گیری خاک depth of (cm) sampling	0-30
بافت خاک Soil texture	لوم رس سیلتی Loam-clay-silt

برداشت زمانی صورت گرفت که حدود ۸۰ درصد گیاهان در

جدول ۲- نتایج تجزیه شیمیایی کودهای آلی

Table 2- Chemical analysis of fertilizers

نمونه Sample	EC (ds/m)	فسفر قابل جذب P (mg.kg ⁻¹)	پتاسیم قابل جذب K (mg.kg ⁻¹)	ازت کل N (%)
کود دامی cattle manure	1.5	116	537	1.48
کمپوست زباله شهری municipal solid waste	11.6	327	352	0.44
خاکبرگ Organic matter	0.64	83	165	1.07

جدول ۳- نتایج آنالیز آب مورد استفاده در مزرعه تحقیقاتی

Table 3- Farm water analysis

Mg (mg.L ⁻¹)	Ca (mg.L ⁻¹)	K (mg.L ⁻¹)	EC (ds.m ⁻¹)	pH	نمونه آب Water
1.5	1.5	1.4	0.6	6.6	

نتایج و بحث

بوته در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. در مقابل قطر گل و وزن هزار دانه بذر تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده قرار نگرفت. همچنین نتایج نشان می دهند که تفاوت معنی داری بین اکوتیپ ها از نظر صفات مورد بررسی وجود ندارد و نیز اثر متقابل بین بستر کشت و اکوتیپ بر اجزای عملکرد گیاهان معنی دار نبود.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها (جدول ۴) نشان داد که تیمارهای مورد بررسی اثر معنی داری بر صفات اندازه گیری شده داشته اند، به طوری که تاثیر نوع بستر بر وزن تر و وزن خشک اندام های هوایی و ریشه، تعداد برگ در بوته، تعداد گل در بوته و تعداد بذر در بوته در سطح احتمال یک درصد معنی دار گردید. طول ریشه و ارتفاع

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر بستر کشت و اکوتیپ بر اجزای عملکرد اکوتیپ های مرزه تابستانه

Table 4- Variance analysis of medium and ecotype effect on yield component in *Satureja hortensis* L.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f.	وزن هزار دانه بذر Seed weight (mg)	تعداد بذر در بوته Number of Seed per bush	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	طول ریشه Root length (cm)
بستر Medium	4	0.00143 ^{ns}	85235400.7**	5.59**	95.42**	40.29*
اکوتیپ Ecotype	2	0.00004 ^{ns}	3166672 ^{ns}	0.44 ^{ns}	6.13 ^{ns}	7.45 ^{ns}
بستر × اکوتیپ Medium × ecotype	8	0.00084 ^{ns}	164747.9 ^{ns}	0.027 ^{ns}	1.24 ^{ns}	3.17 ^{ns}
خطا Error	42	0.0012	4185424.2	0.30	7.01	10.29
ضریب تغییرات C V (%)		5.49	14.58	12.68	12.47	10.33

***، * و ns به ترتیب معنی دار شدن در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری می باشد.

*, ** and ^{ns} are significant at 1 percent, 5 percent and non significant, respectively.

ادامه جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر بستر کشت بر اجزای عملکرد اکوتیپ های مرزه تابستانه

Table 4 continue- Variance analysis of medium and ecotype effect on yield component in *Satureja hortensis* L.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f.	قطر گل Flower width (mm)	تعداد گل در بوته Number of flower	تعداد برگ در بوته Number of leaf	وزن خشک اندام های هوایی Bush dry weight (g)	وزن تر اندام های هوایی Bush fresh weight (g)	ارتفاع بوته Height (cm)
بستر Medium	4	0.067 ^{ns}	11725834.98**	5044444.86**	1872.48**	40660.19**	94**
اکوتیپ Ecotype	2	0.11 ^{ns}	693665.15 ^{ns}	945702.72**	190.85 ^{ns}	1818.45 ^{ns}	1.32 ^{ns}
بستر × اکوتیپ Medium × ecotype	8	0.016 ^{ns}	51523.02 ^{ns}	59061.57 ^{ns}	9.48 ^{ns}	128.17 ^{ns}	0.90 ^{ns}
خطا Error	42	0.046	410434.2	299476.88	159.56	1406.95	15.24
ضریب تغییرات C V (%)		8.95	13.38	10.73	16.42	11.64	8.38

***، * و ns به ترتیب معنی دار شدن در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی داری می باشد.

*, ** and ^{ns} are significant at 1%, 5% and no significant, respectively.

جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر بستر کشت و اکوتیپ بر اجزای عملکرد مرزه تابستانه

Table 5 - Mean comparison of media effect on yield component in *Satureja hortensis* L.

تیمار Treatment	وزن هزار دانه بذر Seed weight (mg)	تعداد بذر در بوته Number of seed per bush	وزن خشک ریشه Root dry weight(g)	وزن تر ریشه Root fresh weight(g)	طول ریشه Root length(cm)
بستر کشت Medium					
شاهد Control	0.64 ^a	9359.7 ^b	3.16 ^b	16.23 ^b	27.8 ^b
کود دامی Cattle manure	0.61 ^a	15159 ^a	4.54 ^a	23.14 ^a	32.26 ^a
کمپوست زباله شهری Municipal solid waste	0.63 ^a	14597.7 ^a	4.49 ^a	21.99 ^a	31.59 ^a
خاکبرگ Organic matter	0.63 ^a	14948.9 ^a	4.78 ^a	22.58 ^a	31.82 ^a
مخلوط Complex	0.64 ^a	16069.3 ^a	4.79 ^a	22.13 ^a	31.79 ^a

حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن می باشد.
The same character have no significant differences in 5% level by Duncan's multiple range test.

ادامه جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر بستر کشت و اکوتیپ بر اجزای عملکرد مرزه تابستانه

Table 5 continue- Mean comparison of media effect on yield component in *Satureja hortensis* L.

تیمار Treatment	قطر گل (میلی متر) Flower width (mm)	تعداد گل در بوته Number of flower	تعداد برگ در بوته Number of leaf	وزن خشک اندام های هوایی (گرم) Bush dry weight (g)	وزن تر اندام های هوایی (گرم) Bush fresh weight (g)	ارتفاع بوته (سانتی متر) Height (cm)
بستر کشت Medium						
شاهد Control	2.45 ^a	3019.5 ^b	3978.3 ^b	54.72 ^b	219.52 ^b	41.85 ^b
کود دامی Cattle manure	2.38 ^a	5200.8 ^a	5575.3 ^a	83.4 ^a	357.7 ^a	49.04 ^a
کمپوست زباله شهری Municipal solid waste	2.33 ^a	5167.4 ^a	5160.5 ^a	79.97 ^a	333.46 ^a	46.31 ^a
خاکبرگ Organic matter	2.34 ^a	5224.7 ^a	5275.2 ^a	82.95 ^a	356.51 ^a	47.45 ^a
مخلوط Complex	2.5 ^a	5313.4 ^a	5503.9 ^a	83.51 ^a	343.33 ^a	48.05 ^a

حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.
The same characters have no significant differences at 5 percent level by Duncan test.

مقایسه میانگین تأثیر بسترهای آلی کشت روی صفات ظاهری مرزه تابستانه

نتایج نشان داد که بالاترین ارتفاع بوته در تیمار کود دامی و کمترین ارتفاع مربوط به کمپوست زباله شهری بود (جدول ۵). همه بسترهای آلی بر ارتفاع بوته گیاه مرزه تابستانه نسبت به تیمار شاهد اثر معنی داری داشتند. به طوریکه در تیمار شاهد کمترین ارتفاع بوته مشاهده شد. این نتایج با یافته های هندوای و همکاران (۱۵) در

بررسی تأثیر کود دامی بر گیاه دارویی آویشن (*Thymus vulgaris*) مبنی بر افزایش ارتفاع بوته توسط این کود آلی مطابقت دارد. نیتروژن دارای اثر تشدیدکنندگی بر رشد رویشی و تقسیمات سلولی اندام های گیاهی به ویژه اندام های هوایی می باشد و باعث افزایش رشد سرشاخه می شود. با توجه به نتایج آنالیز کودهای آلی، میزان ازت موجود در کود دامی نسبت به سایر کودهای آلی نسبتاً بالاتر بوده و می توان تاثیر آن را بر روی رشد رویشی و ارتفاع گیاهان

همکاران (۲۶) که اختلاف معنی‌دار اجزای عملکرد از جمله وزن تر بوته را در اکوتیپ‌های مختلف آویشن کرمانی گزارش کردند، مطابقت ندارد.

بنا به نتایج مقایسه میانگین‌ها بیشترین میزان وزن خشک اندام‌های هوایی تحت تأثیر تیمار مخلوط به دست آمد، هر چند سایر کودهای آلی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. تیمار شاهد کمترین میزان (۵۴/۷۲۱ گرم) را دارا بود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ازت موجود در کودهای آلی باعث تقویت رشد رویشی و افزایش بیوماس شده و پتاسیم بالای این کودها علاوه بر تسریع تقسیم سلولی و تأثیر مستقیم در رشد رویشی به دلیل نقشی که در ساخت هیدرات‌های کربن و پروتئین‌ها و تغلیظ شیره سلولی دارد، باعث افزایش وزن خشک بوته می‌گردد. کاهش نسبت وزن خشک به وزن تر در تیمار کود دامی را می‌توان به این مسأله نسبت داد که گیاهان تحت تأثیر این بستر، به دلیل داشتن ازت بیشتر آن نسبت به بقیه بسترها به دلیل جذب آب بیشتر، از شادابی و رشد سلولی بیشتری به خاطر دارا بودن آب سلولی بیشتر برخوردار بودند. از طرفی، ازت باعث می‌شود که مواد هیدروکربنه کمتری در گیاه ذخیره شود. بنابراین شیره سلولی رقیق‌تر و آبکی‌تر می‌شود و از طرفی دیگر به خاطر اینکه ازت در ساخت دیواره سلولی نقش دارد، هر چه میزان ازت جذبی گیاه بیشتر باشد سلول‌های گیاهی بزرگتری ساخته شده که نسبت به سلول‌های کوچک آبکی‌ترند (۳۵). نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های احمدیان و همکاران (۱) در رابطه با افزایش وزن خشک ساقه‌های زیره سبز تحت تأثیر تیمارهای کود دامی و خاکبرگ مطابقت دارد. در حالی که با نتایج سینگ و همکاران (۳۷) که گزارش نمودند مالچ آلی باعث کاهش معنی‌دار میزان بیوماس گیاه دارویی نناع هندی می‌شود سازگار نیست. در مقایسه میانگین اکوتیپ‌های مختلف از لحاظ میزان وزن خشک اندام‌های هوایی، اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها مشاهده نشد، ولی بیشترین میزان وزن خشک اندام‌های هوایی از اکوتیپ شیراز و کمترین از اکوتیپ یزد بدست آمد. نتایج بدست آمده مربوط به عدم اختلاف معنی‌دار وزن خشک اندام‌های هوایی اکوتیپ‌های مختلف با نتایج مکی‌زاده‌تفتی و همکاران (۲۶) که وزن خشک بوته را در اکوتیپ‌های مختلف آویشن کرمانی معنی‌دار گزارش کردند، مطابقت ندارد.

تعداد برگ در بوته تحت تأثیر تیمار بستر کشت قرار گرفت و در سطح $0.01 <$ معنی‌دار شد. با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵)، بیشترین تعداد برگ در بوته در تیمار کود دامی و کمترین تعداد برگ در بوته مربوط به تیمار شاهد بود. بعد از تیمار کود دامی، تیمار مخلوط، خاکبرگ و کمپوست زباله شهری به ترتیب دارای بیشترین تعداد برگ در بوته بودند که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و همه آن‌ها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. با توجه به نقش فیزیولوژیکی ازت در ساخت مولکول کلروفیل می

قابل توجه دانست. همچنین در یک تحقیق گلدانی روی اثر کود دامی و خاکبرگ بر زیره سبز نتایج مشابهی با نتایج آزمایش حاضر بدست آمد. بدین صورت که خاکبرگ اثر مثبت معنی‌داری روی رشد طولی ساقه هر دو گونه شد ولی در ترکیب با کود دامی بالاترین رشد طولی ساقه حاصل گردید (۱). طبق نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس، اثر اکوتیپ بر صفت ارتفاع بوته معنی‌دار نبود ولی گیاهان اکوتیپ شیراز در مجموع دارای میانگین ارتفاع بیشتری بودند.

بر اساس نتایج تجزیه داده‌ها، بلندترین طول ریشه (۳۲/۲ سانتی متر) مربوط به تیمار کود دامی و کوتاه‌ترین طول ریشه (۲۷/۸ سانتی متر) در تیمار شاهد ثبت شد. همه بسترهای آلی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند و کمترین طول ریشه در بین بسترهای آلی مربوط به کمپوست زباله شهری بود (جدول ۵).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که تیمارهای استفاده شده در سطح یک درصد تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ریشه داشته‌اند. بیشترین میزان وزن تر ریشه (۲۳/۱۴ گرم) از بستر حاوی کود دامی بدست آمد، هر چند سایر بسترهای آلی با بستر کود دامی اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی همه تیمارهای کود آلی با تیمار شاهد (۱۶/۲۳ گرم) اختلاف معنی‌داری داشتند و کمترین میزان وزن تر ریشه در تیمار شاهد بود. کودهای آلی با اصلاح فیزیکی خاک و ایجاد زمینه مناسب برای رشد ریشه باعث تقویت رشد و افزایش وزن ریشه می‌شوند. این نتیجه در آزمایشات هندای و همکاران (۱۵) نیز تایید می‌گردد. بین اکوتیپ‌ها از نظر تأثیر بر وزن تر ریشه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین تیمارهای مختلف، بستر کود دامی بیشتر از سایر بسترها بر میزان وزن تر اندام‌های هوایی اثر مثبت داشت که اختلاف تیمارهای مصرف کودهای آلی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. تیمار شاهد دارای کمترین میزان وزن تر اندام‌های هوایی (۲۱۹/۵۲ گرم) بوده و همه بسترهای آلی با آن اختلاف معنی‌داری داشتند. خلیل (۱۸) به ترتیب در بررسی تأثیر کودهای آلی بر دو گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و یاسمین (*Jasminum spp.*)، حداکثر رشد و اجزای عملکرد را در تیمارهای حاوی کود آلی مشاهده نمود. در آزمایش حاضر افزایش وزن تر اندام‌های هوایی در تیمارهای کود آلی علاوه بر افزایش رشد توسط این کودها می‌تواند ناشی از اصلاح فیزیکی خاک و نگهداری بیشتر آب خاک باشد که در این حالت گیاه بیشترین بهره‌وری را از آب خاک نموده و گیاهان با در دسترس داشتن آب بیشتر نسبت به تیمار شاهد شاداب‌تر و دارای تورژسانس سلولی بیشتر بوده و در نتیجه وزن تر بیشتری خواهند داشت. همچنین در بین اکوتیپ‌های مختلف، بیشترین میزان وزن تر اندام‌های هوایی، مربوط به اکوتیپ شیراز و کمترین مربوط به اکوتیپ یزد بود، ولی هیچ یک از اکوتیپ‌ها با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. این نتایج با نتایج مکی‌زاده‌تفتی و

کمپوست زباله شهری، خاکبرگ و کود دامی به تنهایی نیز با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. با توجه به اینکه تعداد گل در بسترهای آلی نسبت به بستر شاهد اختلاف معنی‌داری داشت افزایش تعداد بذر در بوته در این بسترها نیز مورد انتظار بود. اکوتیپ‌ها با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی اکوتیپ شیراز به دلیل دارا بودن بیشترین تعداد گل، بیشترین تعداد بذر در بوته را نیز به خود اختصاص داد.

مقایسه میانگین تأثیر تیمارها روی صفات کیفی اسانس گیاه مرزه تابستانه

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۶)، تیمارهای مورد بررسی اثر معنی‌داری بر دو ترکیب گاماترپین و پاراسیمن در سطح احتمال یک درصد داشتند، در حالی که درصد اسانس و میزان کارواکرول اسانس تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده قرار نگرفت. نتایج تجزیه واریانس مربوط به اثر اکوتیپ نیز نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها از نظر میزان سه ترکیب مورد بررسی در اسانس وجود داشته ولی درصد اسانس بین اکوتیپ‌های مختلف معنی‌دار نمی‌باشد. اثر متقابل بستر کشت و اکوتیپ نیز برای میزان ترکیبات اسانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

توان گفت که افزایش تعداد برگ در بستر کود دامی می‌تواند مربوط به میزان ازت بالای این بستر در مقایسه با سایر بسترها باشد (۳۵). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان می‌دهد بین اکوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشته و اکوتیپ شیراز دارای بیشترین تعداد برگ در بوته و اکوتیپ یزد دارای کمترین تعداد برگ می‌باشد.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵) بستر مخلوط باعث تولید بیشترین تعداد گل در بوته شد، سایر تیمارها نیز تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. افزایش تعداد گل در بسترهای آلی را می‌توان اینطور استنباط کرد که از یک طرف این کودها با افزایش رشد رویشی و افزایش تعداد شاخساره و از طرف دیگر به خاطر غنی بودن آن‌ها از فسفر که یکی از عناصر مهم برای تشکیل گل می‌باشد باعث تقویت رشد زایشی می‌شوند. در مقایسه اکوتیپ‌های مختلف بین اکوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس، قطر گل تحت تأثیر هیچ یک از بسترهای آلی قرار نگرفت. همچنین در مقایسه اکوتیپ‌های مختلف از لحاظ قطر گل، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی اکوتیپ کردستان دارای بیشترین و اکوتیپ یزد دارای کمترین قطر گل بود.

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین بسترهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۱ < درصد نشان داد. بر طبق مقایسه میانگین‌ها، بستر مخلوط باعث تولید بیشترین تعداد بذر در بوته شد. بسترهای

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر بستر کشت بر کمیت و کیفیت اسانس اکوتیپ‌های مرزه تابستانه

Table 6- Variance analysis of media effect on quality and quantity of essentials oil in *Satureja hortensis* L.

منابع تغییرات	درجه آزادی d.f.	پاراسیمن Paracymene (%)	گاماترپین γ- terpinen (%)	کارواکرول Carvacrol (%)	اسانس Essential oil (g per 100 g dry matter)
بستر Medium	4	0.933 **	2.324**	64.89 ns	0.091 ns
اکوتیپ Ecotype	2	2.229**	6.91**	137.57 *	0.055 ns
بستر × اکوتیپ Medium×ecotype	8	0.518**	10.768**	205.927**	0.006 ns
خطا Error	28	0.038	0.274	30.38	0.036
ضریب تغییرات C V (%)		15.661	10.392	7.8	16.5

ns و * و ** به ترتیب معنی‌دار شدن در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

*, ** and ns are significant at 1 percent, 5 percent and no significant, respectively.

بررسی‌های مختلف در رابطه با تأثیر سیستم کشت ارگانیک بر بازده اسانس نتایج متفاوتی گزارش شده است، به عنوان مثال در رابطه با اثر کود دامی بر گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum*)

طبق نتایج تجزیه واریانس، درصد اسانس مرزه تابستانه تحت تأثیر نوع بستر کشت قرار نگرفت. بین تیمارهای مختلف تیمار کمپوست زباله نسبت به بقیه بیشتر درصد اسانس بیشتری داشت. طی

باشد. به علاوه با توجه به اینکه متابولیت‌های ثانویه محصولات جانبی فتوسنتز هستند افزایش تعداد برگ می‌تواند در افزایش اسانس مؤثر واقع شود.

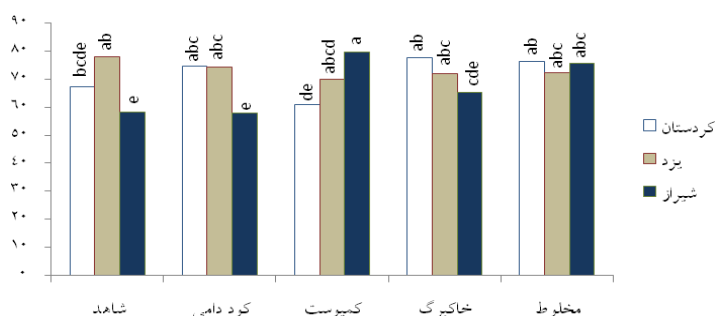
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۶)، بدین صورت بود که گیاهان کشت شده در بسترهای مختلف اختلاف معنی‌داری با هم از لحاظ میزان کارواکرول موجود در اسانس نشان ندادند. ولی بستر مخلوط بیشترین اثر مثبت را روی میزان کارواکرول گیاهان داشت. در تحقیقات دیگر محققان (۳، ۱۲، ۱۸) کارواکرول غالب‌ترین ترکیب موجود در اسانس این گیاه دارویی معرفی شده است و در تحقیق حاضر نیز این ترکیب به عنوان ترکیب غالب شناخته شد. در یک مطالعه مشابه هندوای و همکاران (۱۵) با بررسی کمیت و کیفیت اسانس آویشن تحت تأثیر کود دامی و کمپوست دریافتند که این دو کود آلی باعث افزایش میزان کارواکرول اسانس شده و میزان این ماده از ۰/۱۸ درصد در تیمار شاهد به ۰/۸۵ درصد در تیمار کود دامی و ۰/۴۶ درصد در تیمار کمپوست ارتقا یافت. همچنین حسین و همکاران (۳۱) و عطیه و همکاران (۵) در مطالعه اثر کمپوست به ترتیب روی بادرشبو و آویشن باغی اظهار داشتند که کمپوست باعث افزایش درصد کارواکرول اسانس می‌شود.

بین اکوتیپ‌ها از نظر میزان کارواکرول اسانس اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۱). بیشترین میزان این ماده در اکوتیپ یزد مشاهده شد که با اکوتیپ شیراز اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. در تحقیقات دیگری به اثبات رسیده است. کارواکرول در شرایط آب و هوایی گرم و خشک افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند (۶). هادیان و همکاران (۱۳) نیز در مطالعه توده‌های بومی مرزه تابستانه از مناطق مختلف کشور روند مشابهی را در رابطه با وجود اختلاف معنی‌دار از لحاظ میزان کارواکرول در بین اکوتیپ‌های ارسباران، پل‌دختر و سپیدان با اکوتیپ‌های اراک و نیشابور گزارش کردند. از سوی دیگر در این تحقیق بین اکوتیپ‌های پل‌دختر، ارسباران و سپیدان با یکدیگر و اکوتیپ‌های مریوان، نیشابور و اراک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان ندادند.

احمدیان و همکاران (۱) اعلام کردند که این کود آلی بر صفات فیتوشیمیایی این گیاه دارای تاثیر مثبت بوده و درصد اسانس آن را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد، به علاوه در ارزیابی اثر کمپوست بر گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*)، درصد اسانس به طور معنی‌داری افزایش یافت (۸)، در حالیکه با کاربرد کودهای آلی بر گیاه دارویی مرزنجوش، اسانس این گیاه تحت تاثیر قرار نگرفت (۵). نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر محققین از جمله لچامو (۲۲) و ال‌دسوقی و همکاران (۹) روی سه ژنوتیپ بابونه (*Matricaria chamomilla*) و رازیانه شیرین (*Foeniculum vulgare* M.)، ال‌مسری و داهب (۱۰) روی شمعدانی (*Pelargonium*)، خلیل و همکاران (۱۹) روی گل جعفری (*Tagetes*) و تحقیق نقیب (۳۱) روی بابونه مطابقت دارد. تغییرات آبی مواد شیمیایی موجود در گیاهان تحت تاثیر عوامل زیستی و غیر زیستی (خاک و آب و هوا)، امر مسلمی است. اصولاً مواد ثانویه هم به اقتضای ساختار طبیعی (وراثتی) و هم تحت تأثیر تنش‌های غیرطبیعی در گیاه ساخته می‌شوند. گیاهان دارویی بر خلاف همه محصولات کشاورزی که در اوضاع تنشی از نظر مقدار تولید لطمه می‌بینند ممکن است در این اوضاع تولید شیمیایی بیشتر و در نتیجه بازدهی اقتصادی بهتری پیدا کنند (۱ و ۳۲).

در واکنش *Agetache foeniculum* به تنش شوری ناشی از کلرور سدیم مشخص شد که نمک باعث افزایش درصد اسانس این گیاه می‌شود (۲۰). همچنین حسین و همکاران (۱۶) افزایش درصد اسانس را تحت تاثیر کمپوست در گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) گزارش کردند و این افزایش درصد اسانس را ناشی از افزایش واکنش‌های متابولیکی و تحریک آنزیم‌های دخیل در چرخه تولید اسانس اعلام کردند.

در مقایسه اکوتیپ‌های مختلف از لحاظ درصد اسانس، هیچ‌کدام از اکوتیپ‌ها با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی اکوتیپ شیراز دارای بیشترین درصد اسانس (۱/۲ درصد) بود. اکوتیپ شیراز در مقایسه با دو اکوتیپ دیگر دارای برگ بیشتری بود. بنابراین بالاتر بودن درصد اسانس در این اکوتیپ می‌تواند مرتبط با این خصیصه



شکل ۱- تأثیر متقابل بستر کشت و اکوتیپ بر درصد کارواکرول مرزه تابستانه

Figure 1- Interaction effect of medium and ecotype on carvacrol percentage in *Satureja hortensis* L.

در مطالعه‌ای دیگر نتایج نشان داد که کمپوست باعث افزایش گاماترپین در اسانس گیاه دارویی مرزنجوش شد (۸). همچنین در مقایسه اکوتیپ‌های مختلف، اکوتیپ شیراز دارای بالاترین میزان این ماده بود و با دو اکوتیپ کردستان و یزد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در بررسی تنوع و تعیین خصوصیات فیتوشیمیایی اکوتیپ‌های مختلف آویشن کرمانی توسط مکی‌زاده‌تفتی و همکاران (۲۶)، تنوع زیادی از لحاظ درصد گاماترپین در بین اکوتیپ‌ها گزارش شد (شکل ۲).

نتایج این تحقیق حاکی از آن است که همه بسترهای آلی بر میزان این ماده اثر منفی داشتند بطوریکه کاهش این ترکیب اسانس در بستر مخلوط و بستر کمپوست زباله شهری معنی‌دار بود. امر و همکاران (۸) اعلام کردند که مصرف کودهای آلی هیچ تاثیری بر ترکیبات اسانس گیاه دارویی مرزنجوش ندارد، هنداو و همکاران (۱۵) در آزمایشی، عدم تاثیر ناشی از کاربرد کمپوست و تاثیر منفی ناشی از کاربرد کود دامی بر درصد گاماترپین اسانس را گزارش کردند.

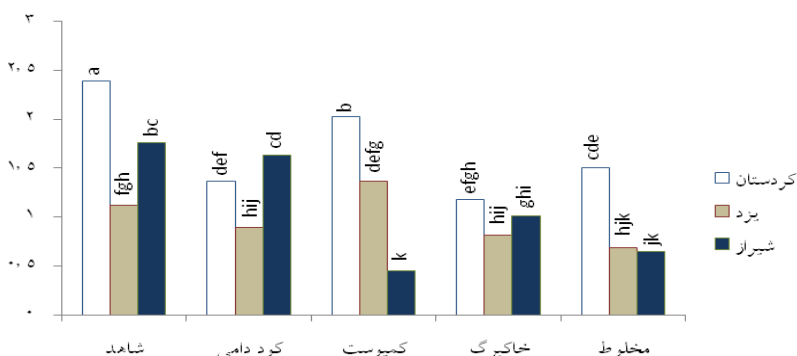


شکل ۲- تأثیر متقابل بستر کشت و اکوتیپ بر درصد گاماترپین مرزه تابستانه

Figure 2- Interaction effect of medium and ecotype on γ -terpinene percentage in *Satureja hortensis* L.

مصرف کود، اختلافی از نظر تجمع کامازولن مشاهده نشد. در مقایسه اثر سیستم تغذیه شیمیایی، ارگانیک و تلفیقی بر گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi*) نیز مشخص شد که کود دامی باعث افزایش معنی‌دار درصد تیمول اسانس شد، در حالی که درصد پاراسیمین تحت تأثیر این تیمار قرار نگرفت (۲)، همچنین در تحقیقی مشابه توسط هنداو و همکاران (۱۵) میزان پاراسیمین اسانس آویشن تحت تأثیر کود دامی و کمپوست قرار نگرفت.

نتایج نشان داد که بیشترین درصد پاراسیمین (۱/۷۶) متعلق به تیمار شاهد بود و همه بسترهای آلی باعث کاهش معنی‌دار این ترکیب اسانس شدند. در مطالعه حاضر میزان ترکیب پاراسیمین نسبت به سایر آزمایشات انجام شده روی مرزه تابستانه کمتر بود (شکل ۳). طبق گزارشات جهان و کوچکی (۱۷)، میزان کامازولن موجود در گل‌های بابونه عکس‌العمل متفاوتی را نسبت به سطوح کود دامی نشان داد، بطوری که میزان این ماده در شرایط عدم مصرف کود دامی به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای مصرف کود بود و بین سطوح



شکل ۳- تأثیر متقابل بستر کشت و اکوتیپ بر درصد پاراسیمین مرزه تابستانه

Figure 3- Interaction effect of medium and ecotype on paracymene percentage in *Satureja hortensis* L.

در بین اکوتیپ‌ها نیز اکوتیپ کردستان بیشترین درصد پاراسیمین (۱/۶۹) را به خود اختصاص داد و با سایر اکوتیپ‌ها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد. هادیان و همکاران (۱۳) در بررسی اکوتیپ‌های مختلف مرزه تابستانه به این نتیجه رسیدند که تفاوت‌های اکوتیپی زیادی از لحاظ درصد پاراسیمین در بین این گیاهان وجود دارد که یافته‌های آن‌ها با نتایج حاضر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بسترهای مختلف بر برخی صفات رشدی اکوتیپ‌های مورد مطالعه اثر معنی‌داری دارد. همه بسترهای آلی به ویژه بستر مخلوط اجزای عملکرد گیاهان را نسبت به شاهد افزایش دادند. در مقایسه بسترهای مختلف، در بستر شاهد بالاترین درصد گاماترپین و پاراسیمین در اسانس مشاهده شد. در مقایسه اکوتیپ‌های مختلف از لحاظ ترکیبات اسانس، اکوتیپ یزد دارای بیشترین درصد کارواکرول، اکوتیپ شیراز دارای بالاترین درصد

منابع

گاماترپین و اکوتیپ کردستان دارای بالاترین میزان پاراسیمین بود. کارواکرول به عنوان جزء ارزشمند اسانس مرزه تابستانه در اکوتیپ شیراز و در تیمار کمپوست زباله شهری به حداکثر تولید (۷۹/۶۳ درصد) رسید و کمترین درصد کارواکرول (۵۷/۷۶) در بستر کود دامی و اکوتیپ شیراز مشاهده شد. در مقایسه کلی اکوتیپ‌ها در بسترهای مختلف بیشترین درصد گاماترپین (۸/۰۱) متعلق به اکوتیپ شیراز و بستر شاهد بود، حداکثر درصد پاراسیمین (۲/۳۸) در بستر شادکام تحت تأثیر بستر شاهد و اکوتیپ کردستان حاصل شد. بطور کلی بستر مخلوط بیشترین اثر را روی اجزای عملکرد به ویژه وزن خشک اندام‌های هوایی و درصد کارواکرول داشت. با توجه به نتایج حاصله و اینکه اختلافی بین مصرف انواع کودهای آلی از لحاظ اجزای عملکرد و درصد اسانس مرزه مشاهده نشد، بنابراین در صورتی که هر یک از انواع کودهای آلی مورد استفاده در این آزمایش در دسترس بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه‌تر باشد، قابل توصیه برای کشاورزان و تولیدکنندگان گیاه دارویی مرزه می‌باشد.

- Ahmadiyan A., Ghanbari A. and Gelavi M. 2006. Effect of animal manure on quantitative and qualitative yield and chemical composition of essential oil in cumin (*Cuminum cyminum*). Journal of Field Crops Research 4(2): 207-216.
- Akbarinia A., Sefidkon F. and Razaz Hashemi S.R. 2009. Essential oil components of cultivated and wild accessions of *Satureja sahendica* Bornm. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25(3): 375-386.
- Alizadeh A., Khoshkhoui M., Javadnia K., Firuzi O., Tafazoli E., and Khalighi A. 2009. Effect of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. Journal of Medicinal Plant Research 4(1): 33-40.
- Alizadeh Sahzabi A., Sharifi Ashorabadi E., Shiranirad A H., Bigdeli M. and Abaszadeh B. 2007. The effects of different methods and levels of using nitrogen on some quality and quantity characteristics of *Satureja hortensis* L.. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 23(3): 416-431.
- Ateia E.M., Osman Y.A.H., and Meawad A.E.A.H. 2009. Effect of organic fertilization on yield and active constituents of *Thymus vulgaris* L. under north Sinai condition. Research Journal of Agriculture and Biological Science P 555-565.
- Baghalian K., and Naghd abadi H. 1999. Aromatic Plants. Andarz Press. 75p.
- Cantino P.D., Harley R.M., and Wagstaff S.J. 1992. Genera of Labiatae status and classification. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), Advances in Labiatae Science. Royal Botanic Gardens, Kew. Press: 511-522.
- Edris A.E., Ahmad S., and Fadel H.M. 2003. Effect of organic agriculture practices on the volatile aroma components of some essential oil plant growing in Egypt II: sweet majoram (*Origanum majorana*) essential oil. Flavour Fragrance Journal 4: 345-351.
- El-Desuki M., Amer A.H., Sawan O.M., and Khattab M.E. 2001. Effect of irrigation and organic fertilization on the growth, bulb yield and quality of sweet fennel under shark El-owinat conditions. Journal of Agricultural Science 26: 4465-4481.
- El-Masry M.H., and Dahab A.A. 2001. Response of geranium plants (*Pelargonium graveolens*) grown in sandy soil to different sources of nitrogen Growth of 5th Arabian Horticultural Conference, 24-28 March Esmailia Suez Canal University, Faculty of Agriculture, Horticultural Department, and Ismailia, Egypt.
- Eskandari M. 2013. Changes in growth parameters and essential oil content of *Satureja bachtiarica* Bunge under the effects of 28-Homobrassinolid and drought stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 29(1): 176-186.
- Ghannadi, A. 2002. Composition of the essential oil of *Satureja hortensis* L. seeds from Iran. Journal of Essential oil Research 14: 35-39.
- Hadian J., Nejad Ebrahimi S., and Salehi P. 2010. Variability of morphological and phytochemical characteristics

- among *Satureja hortensis* L. accession of Iran. Industrial Crops and Products 32: 62-69.
- 14- Hadian J., Tabatabaei S.M.F., Naghavi M.R., Jamzad Z., and Ramak Masoumi T. 2008. Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticulture traits and RAPD markers. Scientia Horticulturae 115: 196-202.
- 15- Hendawy S.F., Azza A., Ezz El Din E., Aziz E., and Omer E.A. 2010. Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization condition. Ozean Journal of Applied Science 203-215.
- 16- Hussein M.S., El-Sherbeny S.E., Khalil M.Y., Naguib N.Y., and Aly S.M. 2006. Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. Cultivation and Production of Medicinal and Aromatic Plants, NRC, Cairo, Egypt. Scientia Horticulturae 108: 322-331.
- 17- Jahan M., and Koocheki A. 2002. Effect of organic production of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) on it's chemical composition. Pajouhesh & Sazandegi Journal 61: 87-95.
- 18- Khalil M.Y. 2002. Biochemical studies on *Rosmarinus officinalis* L. plant tolerance to salinity under compost levels. Annals Agricultural Science 47: 893-909.
- 19- Khalil, M.Y. Naguib, Y.N. and El-Sherbeny, S.E. 2002. Effect of *Tagetes erecta* L. to some foliar application under compost levels. Journal of Agricultural Science 10: 939-964.
- 20- Khorsandi O., Hassani A., Sefidkon F., Shirzad H. and Khorsandi A. 2010. Effect of salinity (NaCl) on growth, yield, essential oil content and composition of *Agastache foeniculum* kuntz. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 26(3): 438-451.
- 21- Kouchaki A. 2004. Organic Field Crop Handbook. Mashhad University Press. 385 p.
- 22- Letchamo, W. 1993. Nitrogen application affects yield and content of the active substances in chamomile genotypes, J. Janick, J.E. Simon, Editors, New Crops, Wiley, New York, pp. 636-639.
- 23- Mahmoodi Sh., and Hakymyan M. 1999. Fundamentals of Soil Science. University of Tehran Press. 701p.
- 24- Malekian M., Hemmati Kh., Ghasemnezhad A., and Barzali M. 2014. Effect of salicylic acid on quantitative and qualitative traits of German chamomile (*Matricaria chamomilla*) ecotypes. Journal of Crop Improvement 16(1): 185-196.
- 25- Mitchell A.E., Hang Y.J., Koh E., Barrett D.M. Bryant D.E., Dension R.F., and Kaffka S. 2007. Ten-year comparison of the influence and conventional crop management practices on the content of flavonoid in tomato. Agricultural food Chemistry 55: 6154-6159.
- 26- Makkizadeh M., Chaichi M., Nasrollahzadeh S., and Khavazi K. 2012. Effect of different types of nitrogen fertilizers on quantitative and qualitative characteristics of *Satureja hortensis* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 28(2): 330-341.
- 27- Makkizadeh Tafti M., Naghdi Badi H., Rezazadeh S., Ajani Y., and Kadkhoda Z. 2010. Evaluation of Botanical Traits and Oil Content/Chemical Composition in Iranian *Thymus carmanicus* Jalas Ecotypes. Journal of Medicinal Plant 4(36): 57-65.
- 28- Mohammadi R., Khayyam-Nekouei M., Mirlohi A.F., and Razmjoo Kh. 2008. Investigation of genetic variation in *Dactylis glomerata* L. populations. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 16(1): 14-26.
- 29- Mohtashami S., Rowshan V., Tabrizi L., Babalar M., and Ghani A. 2018. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil constituent oscillation at different storage conditions. Indian Crop Production 111: 226-231.
- 30- Mozaffarian V. 1998. Dictionary of Iranian plant name. Farhang-e-Moaser pub. 740p.
- 31- Naguib N.Y. 2003. Impact of mineral nitrogen fertilizer and organic compost on growth, herb and chemical composition of German chamomile (*Chamomilla recutita* L.) Rausch. Egypt Journal Applied Science 18: 301-323.
- 32- Omid Beigi R. 2008. Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 2). Astan Quds Publication, Tehran. 414p.
- 33- Omid Beigi R. 2005. Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 1). Astan Quds Publication, Tehran. 438p.
- 34- Omid Beigi R. 1999. Study of chemo types of Iranian wild grown chamomile and compare to improved one. Tarbiat Modares Agriculture Journal (1): 45-53.
- 35- Salardini A., and Mojtahedi A. 1988. Principal of plant nutrition. University of Tehran Press. 489p.
- 36- Sefidkon F. Abbasi Kh., and Bakhshi Khaniki GH. 2005. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis* L.. Food Chemistry 99: 19-23.
- 37- Singh M., Sharma S., and Ramesh S. 2002. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Field Station, Allalasandra, GKVK PO, Bangalore 560 065, India. Industrial Crops and Products 16: 101-107.
- 38- Taleghani D.F. 2007. Effects of different manuring levels on some quantity and quality factors of sugar beet in wheat-sugar beet rotation. Sugar Beet Seed Institute of Iran 22(2): 67-78.



Study of Different Organic Media on Yield Components, Quality and Quantity of Essential Oil of some Savory (*Satureja hortensis* L.) ecotypes in Gorgan

Kh. Hemmati¹ - B. Ardavanpour² - M. Ghazaeian³ - V. Akbarpour^{4*}

Received: 14-06-2017

Accepted: 14-09-2019

Introduction: Essential oils make up a large part of aromatic substances in plants. Generally, essential oils are considered as remnants of main processes of plants metabolism, especially in stressful conditions. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) is one of the most important plants in Lamiaceae family, which it's more than 30 species grown in the East Mediterranean. It is one of the oldest plants that have been used as vegetables and medicinal and aromatic plants. Dried summer savory has been introduced as one of the most pleasant spices that are planting in large areas of farmland in many countries. Generally, the aerial parts of it, that is usually harvested at flowering stage, has therapeutic effects such as facilitating digestion, stomach tonic, diuretic, astringent, carminative, anti-diarrhea and anti-worm. Summer savory essential oil is used in food (conserves and beverages) and pharmaceutical industries. Various studies on *S. hortensis* essential oil has been showed that it contains high amounts of phenolic compounds such as Carvacrol, γ -Terpinene, Thymol, p-Cymene, β -Caryophyllene, Linalool and other terpenoids.

Organic fertilizers have been known to improve the biodiversity and may prove a large depository for excess carbon dioxide. These fertilizers increase the number of soil organisms by providing organic matter and micronutrients for organisms such as fungal mycorrhizae, (which aid plants in absorbing nutrients), and can drastically reduce external inputs of pesticides, energy and fertilizer, at the cost of decreased yield. Nevertheless they are as effective as chemical fertilizers over longer periods of use.

The aim of this project was to study the effects of different organic matters on vegetative and reproductive growth and percentage and components of essential oil in three *Satureja* ecotypes in Gorgan, Golestan, Iran climate.

Materials and Methods: This study was designed as a factorial experiment based on Randomized Complete Block design with four replications and done in research farm of Agriculture and Natural Resource, University of Gorgan in 2010. Treatments were cattle manure, municipal solid waste, leaves compost, the mixture of them and control. Three ecotypes of summer savory studied in this experiment were Kordestan, Shiraz and Yazd.

The plants were harvested at full flowering stage, when they have the highest essential oil and were dried in oven at 45 °C. The essential oils of dried samples were isolated by hydro distillation for 3 h, using a Clevenger-type apparatus.

Statistical analysis was performed by SAS software and the mean comparison were measures by using Duncan tests at 5% level of probability.

Results and Discussion: The analysis of variance showed that media had significant effect on yield components in summer savory. There were no significant differences between ecotypes and media*ecotype effect on some parameters of yield components. The cattle manure showed positive effects on bush height in this experiment. Hendawy et al (2010) showed that the application of cattle manure and sheep manure had reached significantly the 5% level of plant height and essential oils percentages. They concluded that sheep manure have macro and micro nutrients which provide thyme plants with their requirements from these elements. Essential oil percentage also, tended to increase with application of organic fertilizers either cattle manure, sheep manure or compost. Khalil (2002) showed the effect of two kind of organic fertilizers on *Rosmarinus officinalis* and *Jasminum spp* growth parameters and yield components. In this experiment organic manure treatments showed increasing in plant fresh and dry weight. This could be related to positive effect of organic manure on soil texture and fertility. Ahmadian et al. (2006) showed that the animal manure significantly enhanced the number of umbers per plant, the number of seed per plant, the biological and seed yield in *Cuminum cyminum*. Animal manure significantly enhanced cumin aldehyde and p-cymene and decreased β -pinene, γ -terpinene and α -pinene in cumin oil.

1 and 2- Associate Professor and Former M.Sc. Student of Medicinal Plants, Department of Horticultural Sciences, College of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, respectively.

3- Expert of Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center

4- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences Engineering, College of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari

(* - Corresponding Author Email: v_akbarpour60@yahoo.com)

Due to the results, treatments had no significant effects on essential oil percentages, but were effective on essential oil components. Hussein et al. (2006) showed that compost levels combined with different distances had a pronounced effect on the various essential oil constituents in *Dracocephalum moldavica*. In this experiment, Although Shiraz ecotype showed the maximum essential oil percentage (1.2 percent) but there was no significant differences between ecotypes. Among essential oil components, the maximum percentages of Carvacrol achieved in mixture media and Yazd ecotype. Control treatment showed the highest amount of γ -terpinen and paracymene in compare to other media. Shiraz and Kordestan showed also, the highest percentages of γ -terpinen and paracymene, respectively. Plants in mixture media had maximum levels of Carvacrol (74.69 percent). Between ecotypes, Yazd had maximum Carvacrol percentages. Between media, Control treatment was maximum contents of γ -terpinen (5.48) and paracymene (1.76) and other treatments had reduction effects on essential oil components. Between ecotypes, the highest γ -terpinen percentage (5/79) was in Shiraz ecotype and the highest p-cymene percentage (1/69) was in kordistan ecotype.

Conclusion: Therefore, by considering the fertilization of savory plants with different organic manure fertilizers in the form of compost that are economic in each region is recommended.

Keywords: Carvacrol, Cattle manure, Ecotypes, Essential oil quality, γ -terpinen



بررسی پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیک توده‌های بومی علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.) در شرایط تنش خشکی و شوری

محمد حسین شیخ محمدی^۱ - نعمت الله اعتمادی^{۲*} - علی نیکبخت^۳ - مصطفی عرب^۴ - محمد مهدی مجیدی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰

چکیده

خشکی و شوری از جمله تنش‌های غیرزنده مضر برای رشد چمن در طیف گسترده‌ای از جهان می‌باشند. هدف از اجرای این آزمایش، انتخاب توده‌های مقاوم به خشکی و شوری چمن جهت استفاده در برنامه مدیریت چمن در شرایط تنش خشکی و شوری بود. آزمایش به صورت کرت‌های خردشده بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل آزمایش شامل سه تیمار آبیاری بود که به مدت ۴۵ روز اعمال گردید: ۱) گیاهان شاهد (بدون تنش)، ۲) تنش خشکی (قطع آبیاری به مدت ۴۵ روز) ۳) تنش شوری (روانه ۱۰۰ میلی‌لیتر با شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر). تیمارهای آبیاری به عنوان فاکتور اصلی در سه سطح (شاهد، تنش خشکی و تنش شوری) و توده‌های علف گندمی در شش سطح به عنوان کرت فرعی در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد تنش خشکی و شوری باعث کاهش کیفیت در توده‌های علف گندمی تاجدار شدند و سطح کاهش کیفیت بین توده‌ها متفاوت بود. نتایج ما نشان داد، توده سبزوار تحت تنش خشکی و شوری به ترتیب، بالاترین ارتفاع (۵/۵۲ و ۵/۸۶ سانتی‌متر) و بیشترین محتوی کلروفیل (۲/۸۵ و ۲/۷۵ میلی گرم برگرم وزن تر) را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده از بررسی کربوهیدرات‌های محلول اندام هوایی، محتوی آب نسبی و میزان نشت الکترولیت نشان داد که در گیاهان تحت تنش خشکی توده‌های دماوند و سبزوار بیشترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول (۳۳۲/۱۶ و ۳۴۵/۱۴ میلی گرم برگرم وزن خشک)، بیشترین محتوی آب نسبی (۵۹/۱۸ و ۶۲/۱۸ درصد) و کمترین میزان نشت الکترولیت (۴۸/۱۶ و ۵۹/۱۴ درصد) را به خود اختصاص دادند. در شرایط تنش شوری، توده دماوند (۳۲۲/۱۵ میلی گرم برگرم وزن خشک) بیشترین کربوهیدرات محلول، توده سبزوار (۶۸/۴۲ درصد) و اراک (۶۵/۱۴ درصد) بیشترین محتوی آب نسبی و توده سبزوار (۵۴/۱۷ درصد) کمترین میزان نشت الکترولیت را نشان دادند. مطابق نتایج این آزمایش رتبه‌بندی مقاومت به تنش خشکی به صورت سبزوار < دماوند < اراک < ارومیه = تاکستان < هشتگرد و رتبه‌بندی مقاومت به شوری به صورت سبزوار < اراک < دماوند < هشتگرد = تاکستان < ارومیه می‌باشد. توده‌های سبزوار و دماوند مقاومت خوبی نسبت به خشکی، و توده‌های سبزوار و اراک مقاومت خوبی نسبت به تنش شوری در مقایسه با سایر توده‌های علف گندمی تاجدار از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: تنش، چمن، خشکی، شوری، علف گندمی

مقدمه

در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می‌گردد. اکثر گونه‌های چمن فصل سرد به خوبی به خشکی و شوری طولانی‌مدت سازگار نیستند و کاهش کیفیت از مهم‌ترین نگرانی‌های مدیران فضای سبز در این مناطق هست (۹، ۳۵ و ۴۲).

اهمیت خشکی و شوری از آنجا مشخص می‌شود که حدود یک‌سوم از کل زمین‌های دنیا به عنوان مناطق خشک و نیم خشک طبقه‌بندی می‌شوند، همچنین کشور ایران در کمربند بیابانی جهان قرار دارد و ۱/۲ درصد از خشکی‌های جهان را به خود اختصاص داده است. متوسط میزان بارندگی در کشور حدود ۲۵۰ میلی‌لیتر است که این میزان یک‌سوم متوسط بارندگی در جهان می‌باشد (۴۸)، بنابراین توسعه شیوه مدیریت برای بهبود مقاومت به خشکی و شوری چمن‌ها در مناطق خشک و نیمه‌خشک ضروری می‌باشد (۶۵ و ۷۰).

تنش‌های غیر زیستی خشکی و شوری دو عامل مهم محدودکننده رشد چمن‌های فصل سرد می‌باشند و امروزه به دلیل تغییرهای آب و هوایی و گرم‌تر شدن کره زمین به اهمیت آن‌ها افزوده شده است و به یکی از مهم‌ترین مباحث در علوم زیستی تبدیل گردیده است (۲۰، ۲۲ و ۲۷). تنش خشکی و شوری، باعث تغییراتی

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته دکتری تخصصی و دانشیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(*)- نویسنده مسئول: Email: etemadin@cc.iut.ac.ir

۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۵- استاد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

نسبت به ارقام وارداتی دارند (۱۶ و ۱۷). از این رو، مطالعه، انتخاب و اصلاح چمن های بومی جهت استفاده در فضای سبز رو به گسترش است. با توجه به موارد فوق در مطالعه حاضر، ارزیابی پاسخ های مورفولوژیک و فیزیولوژیک ۶ توده بومی علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.) به خشکی و شوری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

به منظور بررسی برخی پاسخ های مورفوفیزیولوژیک ۶ توده بومی علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.) در شرایط تنش خشکی و شوری، آزمایشی به صورت کرت های خرد شده بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طی سال های ۹۵-۱۳۹۴ در محل گلخانه های تحقیقاتی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. تیمارهای آبیاری به عنوان فاکتور اصلی در سه سطح (شاهد، تنش خشکی و تنش شوری) و توده های علف گندمی در شش سطح به عنوان کرت فرعی در نظر گرفته شدند. این تحقیق شامل سه تیمار آبیاری بود که به مدت ۴۵ روز اعمال گردید. ۱) تیمار شاهد (بدون تنش خشکی) ۲) تنش خشکی (قطع آبیاری به مدت ۴۵ روز) ۳) تنش شوری (روزانه با ۱۰۰ میلی لیتر سطح شوری ۹ دسی زیمنس بر متر) که بدین منظور از نمک کلرید سدیم با درجه خلوص ۹۹/۹ درصد استفاده گردید. زمان ۴۵ روز بر اساس نتایج تحقیقات گذشته محققان این پژوهش بر روی گونه های علف گندمی انتخاب گردید. اعمال شوری به صورت تدریجی انجام شد، به طوری که از آب شور با هدایت الکتریکی ۳ دسی زیمنس بر متر برای شروع استفاده شد تا اینکه سطح شوری نهایی به ۹ دسی زیمنس بر متر رسید (۷۳).

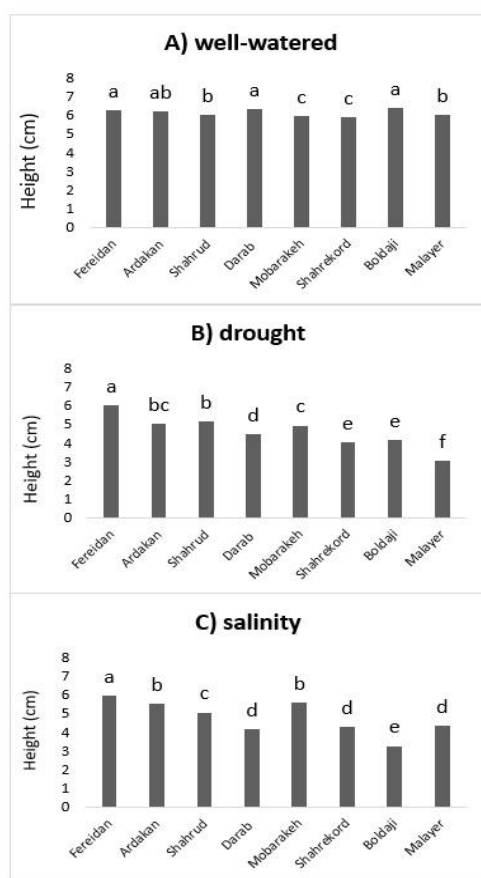
بذور توده های علف گندمی تاجدار مورد استفاده در این تحقیق از رویشگاه های مناطق مختلف کشور (جدول یک) که به صورت طبیعی رشد یافته بودند، جمع آوری شدند. برای کشت توده های بومی از گلدان های پلی اتیلنی با قطر دهانه ۱۶ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر استفاده شد. داخل گلدان ها با سنگریزه به منظور زهکشی پر گردید، سپس گلدان ها با مخلوط خاکی کود، ماسه و خاک باغچه به نسبت حجمی ۳:۲:۱ پر شدند. پس از استقرار کامل و نگهداری در شرایط مناسب از ارتفاع ۴ سانتی متری سرزنی صورت گرفت. علف های هرز به طریق مکانیکی کنترل گردید و چمن ها توسط کود نیتروژن (۷۵ کیلوگرم در هکتار از منبع اوره) در ۳ نوبت تغذیه شدند. پس از استقرار چمن و پوشیده شدن سطح گلدان ها تیمارها اعمال گردید.

اندازه گیری کیفیت از طریق کیفی توسط ارزیابی با تجربه و با استفاده از روش موريس انجام شد (۵۰). بدین منظور ارزیابی ساعت ۱۰ صبح و در یک جهت انجام پذیرفت. در ارزیابی مذکور که بر

ارقام و توده های چمن، پاسخ های متفاوت مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نسبت به خشکی و شوری از خود نشان می دهند که بررسی آن ها می تواند به انتخاب توده مقاوم به خشکی و شوری چمن کمک کند (۵۹). تحقیقات نشان داده است، بسیاری از گونه های بومی، رشد و مقاومت نسبتاً خوبی در شرایط خشک و شور دارند (۴۳). در دهه های اخیر، بهبود قابل توجهی در مقاومت به خشکی و شوری محصولات زراعی از طریق انتخاب معمولی و پرورش آن ها ایجاد شده است (۱۹ و ۷۴). در اصل، شناسایی و بررسی گونه های بومی، می تواند کمک مهمی به یافتن توده های مقاوم به خشکی و شوری کند (۵۲).

علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.) گیاهی فصل سرد با ارتفاع متوسط، چندساله و با عادت رشد کپه ای است که گاهی اوقات تولید ریزوم نیز می کند. سیستم ریشه ای سریع الرشد و گسترده امکان استقرار سریع گیاهچه های علف گندمی تاجدار را فراهم می کند (۴۵). این گیاه در خاک های با بافت متوسط از لومی شنی تا لومی رسی به خوبی رشد می کند. علف گندمی تاجدار به تنش های محیطی مقاوم است و ریشه های فیبری گسترده و بسیار منشعبی دارد و برای جلوگیری از فرسایش خاک و تثبیت آن بسیار مناسب است (۵۱). تاکنون گزارش هایی که باعث مرگ ناشی از تنش خشکی بوده اندک می باشد مگر در مناطقی که گیاه با آن شرایط آب و هوایی سازگار نبوده است (۶۴). پتانسیل و اصلاح چمن علف گندمی به منظور استفاده به عنوان چمن طی چندین مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶، ۱۷ و ۵۸). روبینز و والدرون (۵۷) پتانسیل ژنتیکی ۲۷ جمعیت علف گندمی را برای اصلاح کیفیت چمنی به صورت تک بوته تحت شرایط کم نهاده مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که وراثت پذیری بالایی برای کیفیت چمنی علف گندمی در ماه های تابستان وجود دارد که بیانگر اجزا ژنتیکی افزایشی قوی است. واتکینز و همکاران (۷۱) کیفیت گیاه علف گندمی رقم روید کرسرست را در ۳ سطح سرزنی در شمال آمریکا تحت شرایط کم نهاده مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که این گونه از کیفیت قابل قبولی برخوردار بود همچنین در تحقیقی دیگر پاسخ های فیزیولوژیکی چمن های علف گندمی بیابانی (*Agropyron desertorum*) (Fischer)، پوآ پراتنسیس (*Poa pratensis* L.) رقم "باریمپالا" و بروموس اینرمیس (*Bromus inermis* Leyss) در شرایط تنش خشکی مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج این تحقیق نشان داد با قطع کامل آبیاری به ترتیب چمن های بروموس اینرمیس، پوآ پراتنسیس و علف گندمی بیابانی خشک شدند، بیشترین میزان پرولین، آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و کمترین نشت الکترولیت در گیاه علف گندمی بیابانی مشاهده شد (۶۸). چمن های بومی در طول تاریخ کمتر به عنوان پوشش چمن استفاده شده اند اما به دلیل مقاومت به تنش های محیطی و نیاز به نگهداری کم از اهمیت و ارزش بالایی برخوردار هستند و پس از استقرار نیاز کمتری به آبیاری و کود دهی

کاهش فشار تورژسانس است که منجر به کاهش ارتفاع گیاه و برگ از طریق کاهش تقسیم و طولی شدن سلول‌ها می‌گردد (۵۴). کاهش رشد در خشکی و شوری می‌تواند به دلیل کاهش انرژی مورد نیاز برای رشد در نتیجه انحراف مواد فتوسنتزی به سمت انتقال فعال و جذب یون‌ها باشد (۵۲). در شوری بالا گسترش سلولی می‌تواند در اثر تجمع نمک‌ها در دیواره‌های سلول کاهش یافته و در نتیجه باعث کاهش ارتفاع گیاه گردد (۲۹ و ۷۵).



شکل ۱- تأثیر تنش خشکی و شوری بر ارتفاع توده‌های علف گندمی بیابانی

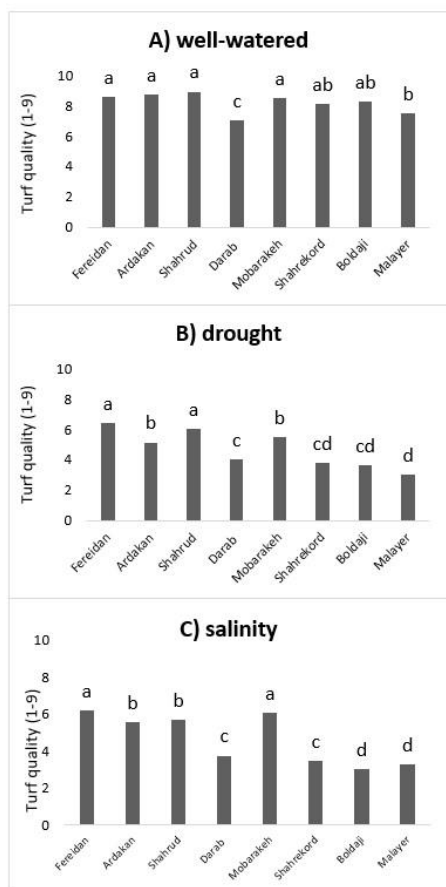
Figure 1- The effects of drought and salinity stress on height of *Agropyron desertorum* genotypes

محتوی کلروفیل: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمارهای آبیاری و توده‌های علف گندمی تأثیر معنی‌داری بر روی محتوی کلروفیل داشته‌اند. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی محتوی کلروفیل (شکل دو- A) نشان داد که در گیاهان با آبیاری مناسب، توده ارومیه (۳/۱۴ میلی گرم برگرم وزن تر) و سبزواری (۳/۲۵ میلی گرم برگرم وزن تر) بیشترین و توده اراک (۲/۷۱ میلی گرم برگرم وزن تر)، کمترین محتوی کلروفیل را دارا می‌باشند. نتایج به‌دست‌آمده از اثر تنش

اساس دستورالعمل NTEP صورت گرفت، امتیاز ۹ به رنگ سبز تیره چمن و امتیاز ۱ به رنگ زرد چمن اختصاص داده شد (۵۰). برای اندازه‌گیری ارتفاع در هر گلدان از ده نقطه‌ی تصادفی، ارتفاع با استفاده از خط کش با دقت یک میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس میانگین آن‌ها محاسبه گردید. جهت تعیین محتوی کلروفیل، نمونه‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد و با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل uv-160 A شیماتزو-کیوتو) و سانتیفریوژ (مدل اپندرف 5810r)، توسط فرمول لیشنتنالر محاسبه شدند (۱۸). اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در اندام هوایی با استفاده از روش اسیدسولفوریک و فنل انجام شد (۱۴). محتوی نسبی آب مطابق با دستورالعمل بارز و ویتزلی (۴) و نشت الکترولیت طبق دستورالعمل بلوم و ابرکون (۷) تخمین زده شدند. صفات مربوط به ریشه شامل عمق نفوذ ریشه و عمق مؤثر ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان آزمایش ریشه‌ها پس از خارج شدن از گلدان شستشو شدند. سپس توسط خط کش با دقت ۱ میلی‌متر عمق نفوذ ریشه (پایین‌ترین عمقی که ریشه در آن توانسته بود قرار بگیرد) و عمق مؤثر ریشه (عمقی که بیشترین تراکم ریشه در آن واقع شده و پایین‌تر از آن به شکل معنی‌داری حجم ریشه کاهش میابد) اندازه‌گیری گردید (۷۲). از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده شد و میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) مقایسه شدند و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

ارتفاع گیاه: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمارهای آبیاری و توده‌های علف گندمی تأثیر معنی‌داری بر روی ارتفاع گیاه داشته‌اند. نتایج این تحقیق نشان داد، در گیاهانی که به‌خوبی آبیاری شده‌اند، توده‌های سبزواری (۶/۱۲ سانتی‌متر) و تاکستان (۶/۳۲ سانتی‌متر) بالاترین ارتفاع گیاه و توده ارومیه (۵/۱۶ سانتی‌متر) کمترین ارتفاع گیاه را دارا بودند (شکل یک- A). نتایج به دست آمده از اثر تنش خشکی بر ارتفاع گیاه نشان داد، توده سبزواری بالاترین ارتفاع گیاه (۵/۵۲ سانتی‌متر) و توده تاکستان (۳/۲۳ سانتی‌متر) کمترین ارتفاع گیاه را تحت تنش خشکی نشان می‌دهند (شکل یک- B). در شرایط تنش شوری، توده سبزواری (۵/۸۶ سانتی‌متر) بیشترین ارتفاع گیاه و توده ارومیه (۳/۵۲ سانتی‌متر) کمترین ارتفاع گیاه را نشان دادند (شکل یک- C). تأثیر تنش خشکی و شوری بر کاهش ارتفاع گونه‌های چمن توسط محققان بسیاری گزارش شده است (۵، ۱۱ و ۲۴). رشد سلول یکی از مهم‌ترین فرآیندهایی است که تحت تأثیر تنش خشکی و شوری قرار می‌گیرد، مطالعات مختلف نشان داده‌اند، توده و ارقام مقاوم، کاهش ارتفاع گیاه کمتری از خود در شرایط تنش خشکی و شوری نشان می‌دهند (۱۵ و ۶۹). اولین علامت درک تنش،



شکل ۲- تأثیر تنش خشکی و شوری بر کیفیت توده های علف گندمی بیابانی

Figure 2- The effects of drought and salinity stress on turf quality of *Agropyron desertorum* genotypes

در شرایط تنش شوری، توده دماوند بیشترین (۳۲۲/۱۵) میلی گرم برگرم وزن خشک) و توده های ارومیه (۲۱۱/۱۹) میلی گرم برگرم وزن خشک) و تاکستان (۱۹۴/۴۵) میلی گرم برگرم وزن خشک) کمترین کربوهیدرات محلول را نشان دادند (شکل سه- C). اسمولیت ها در تنظیم اسمزی بسیاری از گونه های گیاهی نقش مهمی دارند و عموماً به عنوان آمینواسیدهای پروتئینی و غیر پروتئینی، کربوهیدرات های محلول، اسیدهای ارگانیک، الکل ها و یون ها دسته بندی می شوند (۱۹). در دسترس بودن کربوهیدرات محلول اصلی ترین فاکتور در تعیین توانایی گیاه برای تجمع فعال یا غیرفعال اسمولیت های آزاد در فرآیند تنظیم اسمزی است (۲۸ و ۷۴). تجمع کربوهیدرات محلول اندام هوایی در تنش اسمزی توسط محمد و همکاران (۴۷)، لی و همکاران (۳۲ و ۳۳)، کار و همکاران (۳۰)، داسیلوا و همکاران (۱۳) گزارش شده است. بال و همکاران (۳) بیان کردند که در توده های متحمل به تنش چمن بوفالوگراس، غلظت بیشتر کربوهیدرات غیر ساختاری همراه با فعالیت بیشتر آنزیم های آنتی اکسیدانی مشخص

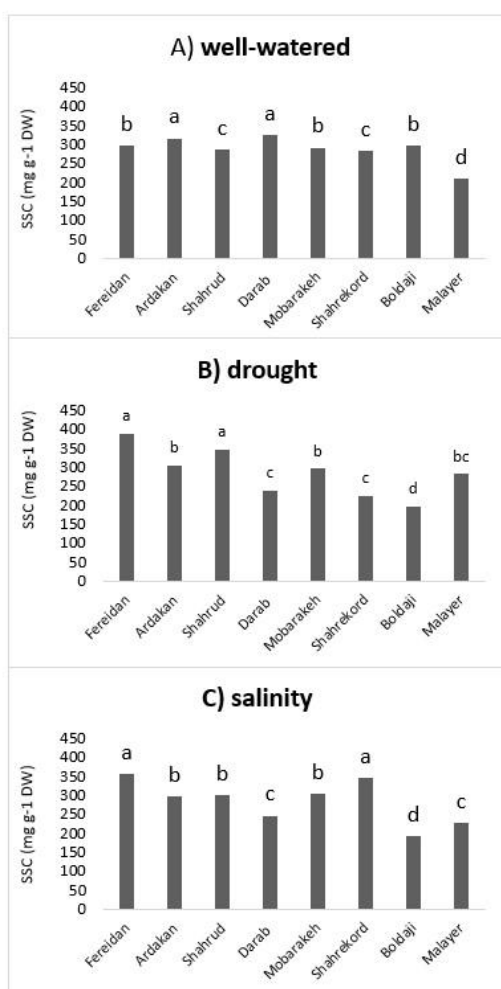
خشکی بر محتوی کلروفیل نشان داد، کمترین محتوی کلروفیل را توده های ارومیه (۲/۰۲ میلی گرم برگرم وزن تر) و اراک (۲/۱۳) میلی گرم برگرم وزن تر)، و بیشترین محتوی کلروفیل را توده سبزوار (۲/۸۵) میلی گرم برگرم وزن تر) به خود اختصاص دادند (شکل دو- B). نتایج به دست آمده از اثر تنش شوری بر محتوی کلروفیل نشان داد، کمترین محتوی کلروفیل را توده های هشتگرد (۱/۹۵) میلی گرم برگرم وزن تر) و تاکستان (۱/۹۲) میلی گرم برگرم وزن تر) و بیشترین محتوی کلروفیل را توده سبزوار (۲/۷۵) میلی گرم برگرم وزن تر) به خود اختصاص دادند (شکل دو- C). سو و همکاران (۵۹) نشان دادند که خشکی میزان انتقال الکترون فتوسنتزی و میزان کلروفیل را کاهش می دهد. ایشان گزارش کردند که از دست دادن کلروفیل در مدت تنش کامل خشکی مربوط به اکسیداسیون نوری است که حاصل تنش اکسایشی بوده و همراه با کاهش در فعالیت آنتی اکسیدان ها و افزایش در پراکسیداسیون اسیدهای چرب است. به گزارش ارغوانی و همکاران (۲) با افزایش شوری در کنتاکی بلوگراس میزان کلروفیل کاهش پیدا کرد. غلظت کلروفیل به عنوان یک شاخص برای ارزیابی مقاومت گیاه شناخته شده است (۲۱ و ۲۵) و لذا کاهش آن در شرایط تنش خشکی و شوری می تواند به عنوان یک عامل محدودکننده غیر روزنه ای به حساب آید (۴۱ و ۷۶). حفظ کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی و شوری، در بسیاری از گونه های گیاهی با مقاومت به تنش همبستگی دارد و به طور عمومی گیاهان مقاوم نسبت به گیاهان حساس، کاهش کلروفیل کمتری از خود نشان می دهند (۲ و ۲۱). گزارش شده که تنش خشکی و شوری در گیاهان باعث پیری زودرس، شکسته شدن کلروپلاست ها و تجزیه کلروفیل در اثر افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز می گردد (۲ و ۴۰). ضمن آنکه کاهش میزان کلروفیل برگ در اثر تنش خشکی و شوری، باعث کاهش کارایی فتوسنتز می شود و گیاهانی که در شرایط تنش میزان کلروفیل خود را در سطح بالایی حفظ می کنند کارایی فتوسنتزی بالاتری دارند (۴۰).

کربوهیدرات های محلول اندام هوایی: نتایج بررسی

کربوهیدرات های محلول اندام هوایی نشان داد که در گیاهان با آبیاری مناسب میزان کربوهیدرات های محلول توده های دماوند (۳۱۲/۱۴) میلی گرم برگرم وزن خشک) و ارومیه (۲۹۶/۲۴) میلی گرم برگرم وزن خشک) بیشتر از چهار توده دیگر بود، کمترین کربوهیدرات های محلول نیز متعلق به توده اراک بود (۲۶۰/۱۵) میلی گرم برگرم وزن خشک) (شکل سه- A). نتایج به دست آمده از بررسی کربوهیدرات های محلول اندام هوایی نشان داد که در گیاهان تحت تنش خشکی، توده تاکستان کمترین (۲۳۶/۱۹) میلی گرم برگرم وزن خشک) و توده های دماوند (۳۳۲/۱۶) میلی گرم برگرم وزن خشک) و سبزوار (۳۴۵/۱۴) میلی گرم برگرم وزن خشک) بیشترین مقدار کربوهیدرات های محلول را داشتند (شکل سه- B).

را توده‌های دماوند (۵۹/۱۸ درصد) و سبزوار (۶۲/۱۸ درصد) تحت تنش خشکی به خود اختصاص دادند (شکل چهار-B). نتایج به‌دست‌آمده از اثر تنش شوری بر محتوی آب نسبی نشان داد، کمترین محتوی آب نسبی را توده هشتگرد (۱۹/۴۵ درصد) و بیشترین محتوی آب نسبی را توده سبزوار (۶۸/۴۲ درصد) و اراک (۶۵/۱۴ درصد) به خود اختصاص دادند (شکل چهار-C).

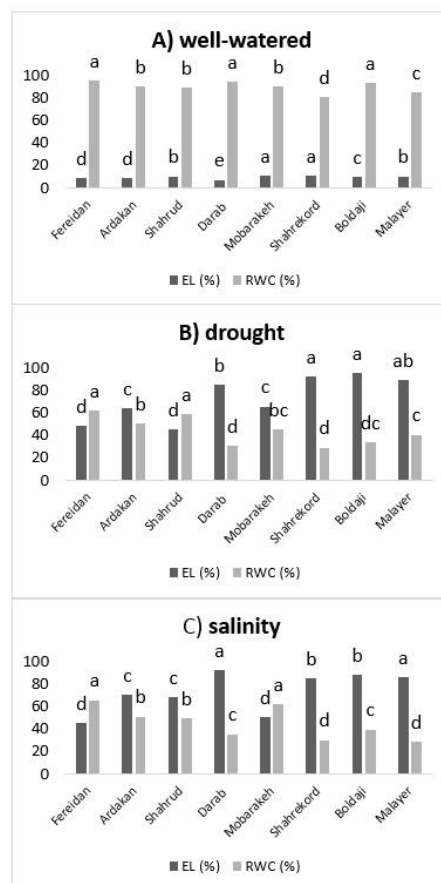
تنظیم اسمزی یکی از مهم‌ترین مؤلفه‌های تحمل به خشکی و شوری است (۳۳) که ارتباط نزدیکی با محتوی آب نسبی برگ دارد (۴۰). کاهش میزان محتوی آب نسبی در اثر تنش خشکی و شوری در تحقیقات سایر محققین بر روی چمن‌های چمنی نیز گزارش شده است که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۱۲، ۱۴ و ۴۹).



شکل ۴- تأثیر تنش خشکی و شوری بر کربوهیدرات محلول توده‌های علف گندمی بیابانی

Figure 4- The effects of drought and salinity stress on soluble carbohydrate of *Agropyron desertorum* genotypes

می‌شود. محققان بسیاری گزارش کرده‌اند که تجمع قندها در ارقام متحمل به خشکی و شوری بیشتر از ارقام حساس است (۳۱ و ۴۶). به نظر می‌آید که تجمع بیشتر کربوهیدرات محلول می‌تواند باعث تنظیم و حفاظت اسمزی گردد و مقادیر بیشتر محتوی آب نسبی و پایداری بهتر غشاء را به دنبال داشته باشد (۷۷).



شکل ۳- تأثیر تنش خشکی و شوری بر محتوی آب نسبی و نشت الکترولیت توده‌های علف گندمی بیابانی

Figure 3- The effects of drought and salinity stress on relative water content and electrolyte leakage of *Agropyron desertorum* genotypes

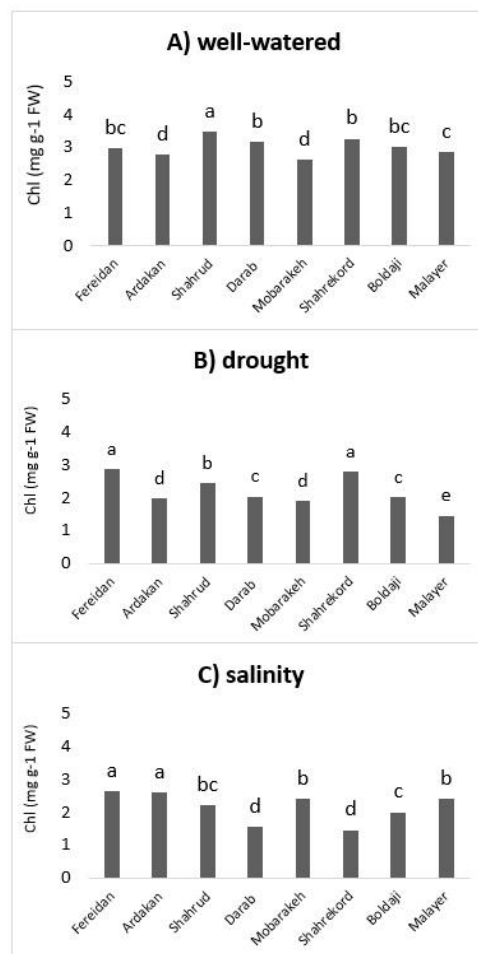
محتوی آب نسبی: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمارهای آبیاری و توده‌های علف گندمی تأثیر معنی‌داری بر روی محتوی آب نسبی داشته‌اند. نتایج حاصل از بررسی میزان محتوی آب نسبی نشان داد که محتوی آب نسبی در هر شش توده گیاهی که به خوبی آبیاری شده بودند، تقریباً در یک سطح قرار دارد (شکل چهار-A). با قطع کامل آبیاری و اعمال تنش شوری، میزان محتوی آب نسبی در هر شش توده گیاهی چمن روند کاهشی داشت. کمترین محتوی آب نسبی را توده تاکستان (۲۰/۱۷ درصد) و بیشترین محتوی آب نسبی

به خشکی و شوری در مقایسه با انواع حساس آن، با سرعت کمتری رطوبت خود را از دست می‌دهند و بین رطوبت برگ‌های جدا شده، تحمل به تنش و توانایی حفظ رطوبت برگ و عملکرد رابطه معنی‌داری وجود دارد (۴۳).

نشت الکترولیت: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد تیمارهای آبیاری و توده‌های علف گندمی تأثیر معنی‌داری بر روی نشت الکترولیت داشته‌اند. نتایج نشان داد که نشت الکترولیت هر شش توده گیاهی چمن در گیاهان شاهد تقریباً در یک سطح قرار دارد (شکل چهار- A). در تیمار قطع آبیاری و تنش شوری، نشت الکترولیت در هر شش توده گیاهی افزایش پیدا کرد، کمترین میزان نشت الکترولیت را به ترتیب توده‌های سبزواری (۴۸/۱۶ درصد) و دماوند (۵۹/۱۴ درصد) و بیشترین میزان نشت الکترولیت را به ترتیب توده‌های ارومیه (۹۰/۱۲ درصد)، تاکستان (۸۸/۱۵ درصد) و هشتگرد (۸۵/۱۶ درصد) تحت تنش خشکی به خود اختصاص دادند (شکل چهار- B). در شرایط تنش شوری، توده سبزواری (۵۴/۱۷ درصد) و اراک (۵۰/۱۴ درصد)، کمترین میزان نشت الکترولیت و توده‌های هشتگرد (۹۱/۲۴ درصد) و ارومیه (۸۹/۳۴ درصد)، بیشترین میزان نشت الکترولیت را نشان دادند (شکل چهار- C).

نشت الکترولیت یکی از شاخص‌های میزان مقاومت گیاه است که تحت شرایط تنش خشکی و شوری افزایش می‌یابد (۱۲ و ۱۴). چای و همکاران (۱۲) تحمل به تنش خشکی را در دو گونه کنتاکی بلوگراس و رای گراس چندساله مورد بررسی قرار دادند و اظهار کردند که کنتاکی بلوگراس در مقایسه با رای گراس چندساله از کیفیت چمنی و کارایی فیتوشیمیایی برگ بالاتر و نشت الکترولیت پایین‌تری در طی دوره تنش برخوردار بود و این‌طور نتیجه گرفتند که تحمل بیشتر کنتاکی بلوگراس در برابر تنش خشکی به تنظیم اسمزی، انعطاف‌پذیری بیشتر دیواره سلولی و پایداری بهتر غشاء سلولی برمی‌گردد. لیون و همکاران (۳۴) نیز عنوان کردند که گونه‌های گیاهی مقاوم به شوری توانایی بیشتری در حفظ سلامت غشاء، تنظیم یون‌ها و در نتیجه تعادل آب سلولی دارا می‌باشند. در طی تنش، خسارت وارده به غشاء سلول می‌تواند عامل محدودکننده برای سلامت سلول باشد (۵۳). درواقع یکی از دلایل مقاومت پایین به تنش خشکی در چمن‌های حساس، به نشت الکترولیت بیشتر در آن‌ها نسبت داده می‌شود (۲۲، ۳۴ و ۳۸). افزایش نشت الکترولیت با پیشرفت تنش توسط تاتاری و همکاران (۶۰) در گیاه علف گندمی بیابانی گزارش شده است. مشخص شده که مؤلفه اصلی در تحمل به هدر رفت آب در چمن‌ها، ثبات غشای سلولی است و افزایش نشت یونی نشان‌دهنده بروز آسیب غشایی است (۵۲).

صفات مربوط به ریشه: نتایج این تحقیق نشان داد، در گیاهانی که به‌خوبی آبیاری شده‌اند، توده‌های دماوند (۱۸/۱۴)



شکل ۵- تأثیر تنش خشکی و شوری بر محتوی کلروفیل توده‌های

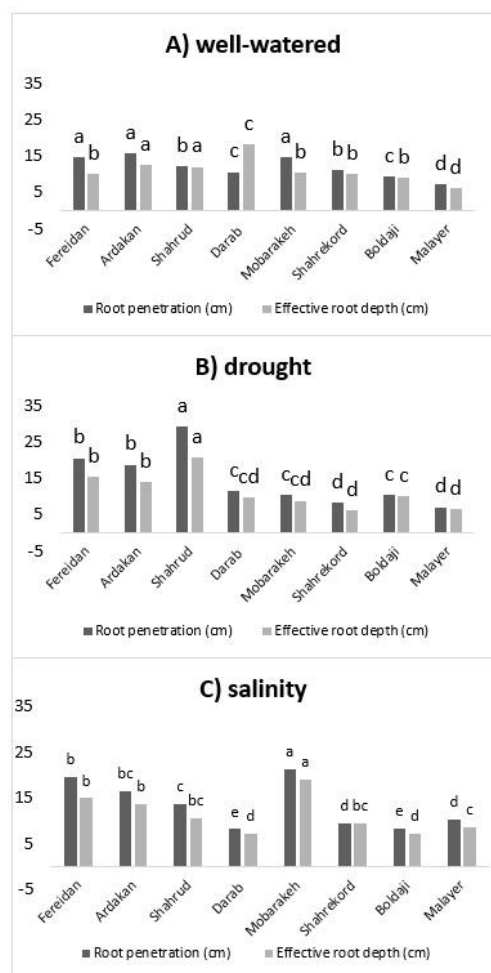
علف گندمی بیابانی

Figure 5- The effects of drought and salinity stress on Chlorophyll of *Agropyron desertorum* genotypes

جیانگ و هوانگ (۲۸) در مطالعه‌ای بر روی کنتاکی بلوگراس دریافتند که تنش خشکی سبب کاهش مقدار آب نسبی برگ در گونه‌های مذکور می‌گردد که شدت کاهش در طول مدت تنش متفاوت است.

بور و همکاران (۸) بیان نمودند که گیاهان متحمل به شوری در مقایسه با انواع حساس آن، با سرعت کمتری رطوبت خود را از دست می‌دهند و بین رطوبت برگ‌های جدا شده، تحمل به شوری و توانایی حفظ رطوبت برگ و عملکرد رابطه معنی‌داری وجود دارد. با کاهش محتوی آب نسبی برگ، ظرفیت فتوسنتزی گیاه کاهش پیدا می‌کند و در اثر آسیب به غشای کلروپلاست‌ها، منتهی به مرگ گیاه می‌شود (۱۲). محتوی آب نسبی بالاتر در شرایط تنش می‌تواند موجب حفظ هدایت روزنه‌ای و در نتیجه تعرق و فتوسنتز بالاتر در گیاه گردد که نشان‌دهنده مقاومت بالاتر به تنش هست (۴۳ و ۵۳). گیاهان متحمل

توده سبزوار و اراک بیشترین کیفیت و توده‌های ارومیه و تاکستان کمترین کیفیت را تحت تنش شوری نشان دادند (شکل پنج- C). کاهش کیفیت چمن تحت شرایط تنش خشکی و شوری، توسط سو و همکاران (۶۵)، جیانگ و هوانگ (۲۸) و چای و همکاران (۱۲) گزارش شده است.



شکل ۶- تأثیر تنش خشکی و شوری بر عمق نفوذ و تراکم ریشه

توده‌های علف گندمی بیابانی

Figure 6- The effects of drought and salinity stress on penetration and effective depth root of *Agropyron desertorum* genotypes

کیفیت چمن یکی از فاکتورهای اصلی برای نشان دادن تحمل کلی چمن در برابر تنش خشکی و شوری است (۱۰). علت اصلی کاهش کیفیت گیاه، کاهش میزان کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی و شوری است که توسط محققین مختلف در گراس‌های چمنی گزارش شده است (۶۱). در منابع متعددی گزارش شده است که میزان کاهش کیفیت در توده‌های حساس به خشکی و شوری، بیشتر از گیاهان مقاوم است (۳۶، ۳۷ و ۶۳). در بررسی مقاومت به خشکی ارقام فستوکای بلند (*Festuca arundinacea* L.) مشخص شد،

سانتی‌متر) و تاکستان (۱۷/۱۵ سانتی‌متر) بالاترین عمق نفوذ ریشه و توده تاکستان (۱۵/۱۶ سانتی‌متر)، بالاترین عمق مؤثر ریشه را نشان دادند (شکل پنج- A). در تیمار تنش خشکی، توده سبزوار، بیشترین عمق نفوذ (۳۰/۱۴ سانتی‌متر) و عمق مؤثر ریشه (۲۰/۲۶ سانتی‌متر) را نشان داد (شکل پنج- B). نتایج به‌دست‌آمده از اثر تنش شوری بر صفات مربوط به ریشه نشان داد، توده سبزوار بالاترین عمق نفوذ ریشه (۳۴/۱۵ سانتی‌متر) و توده اراک (۲۰/۱۱ سانتی‌متر) و سبزوار (۲۴/۲۵ سانتی‌متر)، بالاترین عمق مؤثر ریشه را نشان دادند (شکل پنج- C). سیستم ریشه به‌عنوان یکی از پارامترهای مهم در برنامه‌های اصلاحی برای ایجاد مقاومت به تنش خشکی و شوری مدنظر است (۳۷). طول ریشه طویل‌تر باعث می‌شود که سطح و حجم بیشتری از ریشه‌ها در تماس با خاک قرار گیرد که این امر باعث تسهیل جذب آب و مواد غذایی تحت شرایط تنش خشکی می‌شود (۵۳). تنش خشکی و شوری از طریق کاهش پتانسیل آب برگ و به دنبال آن کاهش فتوسنتز باعث کاهش عمق نفوذ و تراکم ریشه می‌شود (۵۳). ماهاجان و توتجا (۳۹) گزارش کردند که در زمان بروز تنش، رشد نسبی ریشه افزایش می‌یابد تا سیستم ریشه آب بیشتری را از لایه‌های عمیق‌تر خاک استخراج کند. کیان (۵۵) گزارش کرد که تحت شرایط تنش خشکی، رطوبت حجمی خاک در لایه‌های سطحی به‌سرعت کاهش می‌یابد درحالی‌که از محتوای رطوبتی خاک در اعماق پایین‌تر به‌کندی کاسته می‌گردد که در این حالت گیاه برای جذب آب طول ریشه را افزایش می‌دهد. مکان و هوانگ (۴۴) با بررسی ارقام مختلف کریپینگ بنت گراس گزارش کردند که تنش خشکی طول کل ریشه و تعداد ریشه را در ارقام مختلف این گیاه کاهش می‌دهد ولی شدت این کاهش در ارقام متفاوت بود.

نتایج تحقیقی نشان داد بین جمعیت‌های مختلف مرغ از نظر مقاومت به خشکی بر اساس طول نفوذ ریشه، تفاوت‌های معنی‌داری وجود دارد. به‌گونه‌ای که ارقام مقاوم بیشترین طول ریشه را نسبت به ارقام حساس داشتند (۱). افزایش عمق نفوذ ریشه در شرایط تنش، منجر به افزایش ظرفیت جذب آب در لایه‌های عمیق خاک می‌شود تا میزان کاهش آب در لایه‌های سطحی را جبران کند (۲۳). در ارقام حساس، خشک شدن خاک منجر به کاهش رشد و کاهش جذب آب در دو سطح بالایی و پایینی خاک می‌شود (۲۶).

کیفیت: نتایج نشان داد که کیفیت پنج توده هشتگرد، اراک، تاکستان، دماوند و سبزوار در گیاهان شاهد تقریباً در یک سطح قرار گرفته و توده ارومیه کیفیت پایین‌تری از خود نشان داد (شکل شش- A). در تیمار تنش خشکی کیفیت چمن در هر شش توده چمن کاهش پیدا کرد. کمترین و بیشترین میزان کیفیت را به ترتیب توده سبزوار و توده هشتگرد به خود اختصاص دادند (شکل پنج- B). در شرایط تنش شوری، کیفیت چمن در هر شش توده کاهش پیدا کرد،

کاهش رنگ این چمن تحت تأثیر تنش خشکی به دلایلی چون کلروز، سوختگی و پژمردگی برگ مربوط می‌شود (۱۰).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد تنش خشکی و شوری باعث کاهش کیفیت در توده‌های علف گندمی تاجدار شده‌اند و سطح کاهش کیفیت بین توده‌ها متفاوت بود. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک، رتبه‌بندی مقاومت به خشکی به صورت سبزوار < دماوند < اراک < ارومیه = تاکستان < هشتگرد و رتبه‌بندی مقاومت به شوری به صورت سبزوار < اراک < دماوند < هشتگرد =

تاکستان < ارومیه هست. به طور خلاصه، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که توده‌های سبزوار و دماوند مقاومت خوبی نسبت به خشکی و توده‌های سبزوار و اراک مقاومت خوبی نسبت به تنش شوری نسبت به سایر توده‌های علف گندمی تاجدار از خود نشان دادند. این توده‌ها در مجموع با بهبود صفاتی همچون ارتفاع، حفظ محتوی کلروفیل، تجمع بیشتر کربوهیدرات محلول، محتوی آب نسبی بالاتر و نشت الکترولیت کمتر، افزایش عمق نفوذ و تراکم ریشه در شرایط تنش، مقاومت بالاتری از خود نشان دادند و می‌توان از این چمن‌ها به عنوان چمن بومی دارای پتانسیل مقاومت به تنش خشکی و شوری یاد کرد.

جدول ۱- محل جمع‌آوری توده‌های بومی علف گندمی تاجدار (*Agropyron cristatum* L.)

Table 1- Site collection of native Iranian Crested wheatgrass genotypes (*Agropyron cristatum* L.)

توده Landrace	منطقه Region	طول جغرافیایی Longitude (E)	عرض جغرافیایی Latitude (N)	ارتفاع Altitude (m)	متوسط دمای سالانه Average annual temperature (°C)	متوسط بارش سالانه Annual rainfall (mm/year)
هشتگرد Hashtgerd	هشتگرد-البرز Hashtgerd-Alborz	50.6846	35.9614	1175	14.6	377
اراک Arak	اراک-مرکزی Arak-Markazi	49.7013	34.0954	1750	13.9	311
ارومیه Urmia	ارومیه-آذربایجان Urmia-Azerbaijan	45.0433	37.3309	1330	10.6	555
تاکستان Takestan	تاکستان-قزوین Takestan-Qazvin	49.7013	36.0721	1260	18.1	350
دماوند Damavand	دماوند-تهران Damavand-Tehran	52.0631	35.5721	1903	12.1	149
سبزوار Sabzevar	سبزوار-خراسان رضوی Sabzevar-Khorasan Razavi	57.6678	36.2152	977	18.2	330

منابع

- Ahmadi S.S., Basiri M., and Etemadi N. 2013. Comparison of Drought Resistance of Five Species, Cultivars and Populations of Lawn for Using in Landscape. International Journal of Horticultural Science and Technology 13: 391-404.
- Arghavani M., Kafi M., Babalar M., Naderi R., Hoque M.A., and Murata Y. 2012. Improvement of salt tolerance in Kentucky bluegrass by trinexapac-ethyl. HortScience 47: 1163-1170.
- Ball S., Qian Y.L., and Stushnof C. 2002. Soluble carbohydrates in two buffalo grass cultivars with contrasting freezing tolerance. HortScience 127: 45-49.
- Barrs H.D., and Weatherley P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences 15: 413-428.
- Ben-Amor N., Jiménez A., Megdiche W., Lundqvist M., Sevilla F. and Abdelly C. 2007. Kinetics of the anti-oxidant response to salinity in the halophyte *Cakile maritime*. Journal of Integrative Plant Biology 49: 982-992.
- Bian S., and Jiang, Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Scientia Horticulturae 120: 264-270.
- Blum A., and Ebercon A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat.

- Crop Science 21: 43-47.
- 8- Bor M., Ozdemir F., and Turkan I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant Science 164: 77-84.
- 9- Cao Y.J., Wei Q., Liao Y., Song H.L., Li X., Xiang C.B. and Kuai B.K. 2009. Ectopic overexpression of At HDG11 in tall fescue resulted in enhanced tolerance to drought and salt stress. Plant Cell R 28: 579-588.
- 10- Carrow R.N., and Duncan R.R. 2003. Improving drought resistance and persistence in turf-type tall fescue. Crop Science 43: 978-984.
- 11- Chen J., Yan J., Qian Y., Jiang Y., Zhang T., Guo H., Guo A., and Liu J. 2009. Growth responses and ion regulation of four warm season turfgrasses to long-term salinity stress. Scientia Horticulturae 122: 620-625.
- 12- Chi Q., Jin F., Merewitz E., and Huang B. 2010. Growth and physiological traits associated with drought survival and post-drought recovery in perennial turfgrass species. American Society for Horticultural Science 135: 125-133.
- 13- Da-Silva J.M., and Arrabaca M.C. 2004. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C₄ grass *Setaria sphacelata*: A comparison between rapidly and slowly imposed water stresses. Journal of Plant Physiology 161: 551-555.
- 14- DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.
- 15- Fu J., and Huang B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environmental and Experimental Botany 45: 105-114.
- 16- Hanks J.D., Johnson P.G., and Waldron B.L. 2006. Recommended seeding rates for reduced-maintenance, turf-type wheatgrasses. Online. Applied Turfgrass Science. doi: 10.1094/ATS-2006-0808-01-RS.
- 17- Hanks J.D., Waldron B.L., Johnson P.G., Jensen K.B., and Asay K.H. 2005. Breeding CWG-R crested wheatgrass for reduced-maintenance turf. Crop Science 45: 524-528.
- 18- Hiscox J.D., and Israelstam G.F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canadian Journal of Botany 57: 1332-1334.
- 19- Hu L., and Hu T. 2012. Exogenous Glycine betaine ameliorates the adverse effect of salt stress on perennial ryegrass. Journal of the American Society for Horticultural Science 137: 38-46.
- 20- Hu L., Huang Z., Liu S., and Fu J. 2012. Growth Response and Gene Expression in Antioxidant-related Enzymes in Two Bermudagrass Genotypes Differing in Salt Tolerance. Journal of the American Society for Horticultural Science 137: 134-143.
- 21- Hu Z., Amombo E., Gitau M.M., Bi A., Zhu H., Zhang L., Chen L., and Fu J. 2017. Changes of antioxidant defense system and fatty acid composition in bermudagrass under chilling stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 142: 101-109.
- 22- Hu Z., Liu A., Gitau M.M., Huang X., Chen L., and Fu J. 2018. Insights into the MicroRNA-regulated response of bermudagrass to cold and salt stress. Environmental and Experimental Botany 145: 64-74.
- 23- Huang B. 1997. Drought-Resistance Mechanisms of Seven Warm- Season Turfgrasses under Surface Soil Drying: I. Shoot Response. Crop Science 1858-1863.
- 24- Huang B. and Fu J. 2001. Growth and physiological responses of tall fescue to surface soil drying. Intl. International Turfgrass Society Research Journal 9: 291-296.
- 25- Huang B., and Fu J. 2001. Growth and physiological responses of tall fescue to surface soil drying. Journal of Agricultural Science and Technology 9: 291-296.
- 26- Huang B., and GAO H. 2000. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. Crop Science 40: 196-203.
- 27- Iftikhar Hussain M.A., Farooq M., Nikoloudakis N., and Khalid N. 2016. Salt and drought stresses in safflower: a review. Agronomy for Sustainable Developmen. Dev. 36:4.
- 28- Jiang Y., and Huang B. 2000. Effects of drought or heat stress alone and in combination on Kentucky bluegrass. Crop Science 40: 1358-1362.
- 29- Kamal Uddin M, Juraimi A.S., Ismail M.R., Rahim M.A., and Radziah O. 2009. Growth response of eight tropical turfgrass to salinity. African Journal of Biotechnology 8: 5799-5806.
- 30- Kaur K., Gupta A.K., and Kaur N. 2007. Effect of water deficit on carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism in seedlings of wheat cultivars. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 44: 223-230.
- 31- Kerepesi I., and Galiba G. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science 40: 482-487.
- 32- Lee G.J., Carrow R.N., and Duncan R.R. 2008. Identification of new soluble sugars accumulated in a halophytic seashore paspalum ecotype under salinity stress. Horticulture, Environment, and Biotechnology 49(1): 13-19.
- 33- Lee G.J., Carrow R.N., Duncan R.R., Eiteman M.A. and Rieger M.W. 2008. Synthesis of organic osmolytes and salt tolerance mechanisms in *Paspalum vaginatum*. Environmental and Experimental Botany 63(1-3): 19-27.
- 34- Liu Y., Du H., Kai W., Bingru H. and Zhaolong W. 2011. Differential Photosynthetic Responses to Salinity Stress

- between Two Perennial Grass Species Contrasting in Salinity Tolerance. *HortScience* 46(2): 311–316.
- 35- Liu N., Lin S., and Huang B. 2017. Differential Effects of Glycine Betaine and Spermidine on Osmotic Adjustment and Antioxidant Defense Contributing to Improved Drought Tolerance in Creeping Bentgrass. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 142(1): 20–26.
- 36- Liu T., Zhuang L. and Huang B. 2019. Metabolic adjustment and gene expression for root sodium transport and calcium signaling contribute to salt tolerance in *Agrostis* grass species. *Plant Soil*.
- 37- Longxing H., Zehui H., Shuqian L., and Jinmin F. 2012. Growth response and gene expression in antioxidant-related enzymes in two bermudagrass genotypes differing in salt tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137: 134–143.
- 38- Lv A., Fan N., Xie J., Yuan S., An Y., and Zhou P., 2017. Expression of CdDHN4, a novel YSK2-type dehydrin gene from bermudagrass, responses to drought stress through the ABA-dependent signal pathway. *Frontiers in Plant Science* 8: 748.
- 39- Mahajan S., and Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stress an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139–158.
- 40- Malonaka K., Oaiawa T., and Imagawa H. 2006. Changes in chloroplast peroxidase activities in relation to chlorophyll loss in barley leaf segments. *Physiologia Plantarum* 80(4): 555–560.
- 41- Mayoral M.L., Atsmon D., Shimshi D., and Gromet-Elhanan Z. 1981. Effect of Water Stress on Enzyme Activities in Wheat and Related Wild Species: Carboxylase Activity, Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Chloroplasts. *Australian Journal of Agricultural Research* 8: 385–393.
- 42- McCann S.E., and Huang B. 2008. Drought Responses of Kentucky Bluegrass and Creeping Bentgrass as Affected by Absciscic Acid and Trinexapac-ethyl. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 20–26.
- 43- McCann S.E., and Huang B. 2008. Evaluation of drought tolerance and avoidance traits for six creeping bentgrass cultivars. *HortScience* 43: 519–524.
- 44- McCann S.E., and Huang B. 2008. Evaluation of drought tolerance and avoidance traits for six creeping bentgrass cultivars. *Hortscience* 43(2): 519–524.
- 45- Meng L., Guo Q., Mao P., and Tian X. 2013. Accumulation and Tolerance Characteristics of Zinc in *Agropyron cristatum* Plants Exposed to Zinc-Contaminated Soil. *Environmental Contamination and Toxicology* 3: 298–301.
- 46- Michael T.M., Rod L.B., John R.C., and Barker D. 2000. Pinitol accumulation in mature leaves of white clover in response to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 43: 11–18.
- 47- Mohamed A., Shahba S., Alshammery F., and Mohamed S.A. 2012. Effects of Salinity on Seashore Paspalum Cultivars at Different Mowing Heights. *Crop Science* 52: 1358–1370.
- 48- Mohammadi R., Haghparast R. Aghaee-Sarbarze M., and Abdollahi A.V. 2006. An evaluation of drought tolerance in advanced durum wheat genotypes based on physiologic characteristics and other related indices. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 37: 561–567.
- 49- Mohammadi F., Kavousi H.R., and Mansouri A. 2019. Effects of salt stress on physio-biochemical characters and gene expressions in halophyte grass *Leptochloa fusca* (L.) Kunth. M. *Acta Physiologiae Plantarum* 41: 143.
- 50- Morris K.N. 2002. A guide to NTEP turfgrass rating. *National Turfgrass Evaluation Program* 11: 30–39.
- 51- Ochoa V., Madrid E., Said M., Rubiales D., and Cabrera A. 2015. Molecular and cytogenetic characterization of a common wheat-*Agropyron cristatum* chromosome translocation conferring resistance to leaf rust. *Euphytica* 201: 89–95.
- 52- Pessarakli M. 2008. Handbook of turfgrass management and physiology. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 53- Pessarakli M., and Kopec D.M. 2008. Comparing growth responses of selected cool-season turfgrasses under salinity and drought stresses. *Acta Horticulturae* 783: 169–174.
- 54- Poss J.A., Russell W.B., Bonos S.A., and Grieve C.M. 2010. Salt tolerance and canopy reflectance of Kentucky bluegrass cultivars. *Hortscience* 45: 952–960.
- 55- Qian Y. 1996. Irrigation frequency affects zoysiagrass rooting and plant water status. *HortScience* 31: 234–237.
- 56- Qian Y.L., and Fry J.d. 1996. Irrigation frequency affects zoysia grass rooting and plant water status. *HortScience*. 31: 234–237.
- 57- Robins J.G., and Waldron B.L. 2007. Potential for the improvement of turf quality in crested wheatgrass for low-maintenance conditions. *Hortscience* 42(7): 1526–1529.
- 58- Robins J.G., Waldron B.L., Cook D.W., Jensen K.B., and Asay K.H. 2006. Evaluation of crested wheatgrass managed as turfgrass. Online. *Applied Turfgrass Science*. doi: 10.1094/ATS-2006-0523-01-RS.
- 59- Roohollahi I., Kafi M., and Naderi R. 2010. Drought reaction and rooting characteristics in response to plant growth regulators on *Poa pratensis* cv. Barimpala. *he Journal of Food, Agriculture and Environment* 8: 285–288.
- 60- Samar Raza M.A., Saleem F., Khan I.H., Jamil M., Ijaz M., and Khan M.A. 2012. Evaluating the drought stress tolerance efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Russian Journal of Agricultural and Socio-economic Sciences* 12: 41–46.
- 61- Samieiani E., Ansari H., Azizi M., Hashemi-Nia S.M., and Salahvarzi Y. 2013. Effects of drought stress on some biochemical indices of four groundcovers (*Lolium perenne*, *Potentilla* spp., *Trifolium repens* and *Frankenia* spp.)

- with potential usage in landscape. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture* 4: 101-110.
- 62- Sarmast M.K., Salehi H., and Niazi A. 2015. Biochemical differences underlie varying drought tolerance in four *Festuca arundinacea* Schreb. Genotypes subjected to short water scarcity. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1-13.
- 63- Shahba M.A., Alshammary S.F., and Abbas M.S. 2012. Effects of salinity on seashore paspalum cultivars at different mowing heights. *Crop Science* 52: 1358-1370.
- 64- Shan C., He F., Xu G., Han R., and Liang Z. 2012. Nitric oxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. *Biologia Plantarum* 56: 187-191.
- 65- Su K., Moss J.Q., Zhang G., and Wu Y. 2013. Bermudagrass Drought Tolerance Associated with Dehydrin Protein Expression during Drought Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 138(4): 277-282.
- 66- Tan S., Dong F., Yang Y., Zeng Q., Chen B., and Jiang L. 2017. Effects of waterlogging and cadmium on ecophysiological responses and metal bio-accumulation in Bermuda grass (*Cynodon dactylon*). *Environmental Earth Sciences* 76: 719.
- 67- Tatari M., Fotouhi Ghazvini R., Etemadi N., Ahadi A.M., and Mousavi A. 2013. Study of some physiological responses in three species of turfgrass in drought stress conditions. *International Journal of Plant Production* 20: 63-87.
- 68- Tatari M., Ghazvini F.R., Etemadi N., Ahadi A.M., and Mousavi A. 2012. Analysis of Antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation and proline content of *Agropyron desertorum* under drought stress. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment* 3: 9-24.
- 69- Wang Z., Huang B., and Xu Q. 2003. Genotypic variation in abscisic acid accumulation, water relations, and gas exchange for Kentucky bluegrass exposed to drought stress. *HortScience* 128: 349-355.
- 70- Watkins E., Fei S., Gardner D., Stier J., Bughrara S., Li D., Bigelow C., Schleicher L., Horgan B., and Diesburg K. 2011. Low-input turfgrass species for the north central United States. Online. *Applied Turfgrass Science*.
- 71- Watkins E., Fei S., Gardner D., Stier J., Bughrara S., Li D., Bigelow C., Schleicher L., Horgan B., and Diesburg K. 2011. Low-input turfgrass species for the north central United States. Online. *Applied Turfgrass Science*. doi: 10.1094/ATS-2011-0126-02-RS.
- 72- Weaver J.E., and Zink E. 1946. Length of Life of Roots of Ten Species of Perennial Range and Pasture Grasses. *Agronomy & Horticulture*. Faculty Publications. Paper 500.
- 73- Yang Z., Yu J., Merewitz E., and Huang B. 2012. Differential Effects of Absciscic Acid and Glycine Betaine on Physiological Responses to Drought and Salinity Stress for Two Perennial Grass Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 137: 96-106.
- 74- Yin X., Zhang C., Song X., and Jiang Y. 2017. Interactive short-term effects of waterlogging and salinity stress on growth and carbohydrate, lipid peroxidation, and nutrients in two perennial ryegrass cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 142: 110-118
- 75- Yin D., Zhang J., Jing R., Qu Q., Guan H., Zhang L., and Dong L. 2018. Effect of salinity on ion homeostasis in three halophyte species, *Limonium bicolor*, *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham and *Apocynaceae venetum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 40:40
- 76- Zandalinas S.I., Mittler R., Balfago'n D., Arbona V., Go'mez Cadenas A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 162(1): 2-12.
- 77- Zhou L., Shi P., and Peng Y. 2013. Improved drought tolerance through drought preconditioning associated with changes in antioxidant enzyme activities, gene expression and osmoregulatory solutes accumulation in White clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Omics Journal* 6: 481-489.



Study of Morphophysiological Responses of Iranian Crested Wheatgrass Genotypes (*Agropyron cristatum* L.) under Drought and Salinity Stresses

M.H. Sheikh Mohammadi¹- N. Etemadi^{2*}- A. Nikbakht³- M. Arab⁴- M.M. Majidi⁵

Received: 29-01-2017

Accepted: 11-09-2019

Introduction: Drought and salinity are the most detrimental abiotic stresses for turfgrass growth across a wide range of geographic locations. Most cool season grass species are not well adapted to extended periods of drought and salinity stress. The decline in turf quality caused by drought and salinity stresses is a major concern in turfgrass cultivation and management. Therefore, developing management practices for improving drought and salinity resistance of turfgrasses has become imperative in arid and semiarid regions. Grass genotypes differ in their responses to drought and salinity stresses, which involve changes in morphological and physiological aspects. Understanding of relative involvement of each morphological and physiological characteristic in drought and salinity tolerance is important in selecting grass genotypes to facilitate breeding of drought and salinity-tolerant genotypes. The purposes of this research were to make selections of genotypes tolerant to drought and salinity stress for turfgrass management program.

Materials and Methods: To study some morphological and physiological responses of six Iranian crested wheatgrasses (*Agropyron cristatum* L.) under drought and salinity, an experiment was conducted in the greenhouse of College of Abureyhan, University of Tehran, Iran. Six Iranian *Agropyron cristatum* genotypes were collected from six locations in Iran. *Agropyron cristatum* genotypes were planted in polyvinyl chloride tubes and kept in the greenhouse. Pots were filled with sandy loam soil which had been sterilized in an oven at 160°C for 6 h. Irrigation was applied as needed to prevent any visible stress during grass establishment. Grasses were watered three times weekly to maintain plants under well-watered conditions and soil moisture at field capacity. The experiment consisted of three treatments: 1) well-watered plants were irrigated three times per week with distilled water (control), 2) Drought stress was imposed by withholding irrigation for 45 days (drought stress), and 3) plants were irrigated daily with 100 mL of 9 dS.m⁻¹ NaCl solution (salinity stress). To avoid primary salinity shock, the soil in each pot was drenched with 100 mL NaCl solution at incremental electrical conductivity (EC) by 3 dS.m⁻¹ per day until the final EC reached 9 dS.m⁻¹. Data were subjected to analysis based on a split-plot design with water treatments as main-plots and genotypes as sub-plots. Irrigation treatment as the main factor in three levels (control, drought, and salinity) and crested wheatgrass at six levels were considered as sub-plots. Studied characteristics such as height, turf quality, chlorophyll content, soluble carbohydrates, relative water content, electrolyte leakage, root penetration, and effective root depth were recorded. Statistical significance was tested using the analysis of variance procedure in SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Differences between the means were determined using the Fisher's protected LSD test at the 5% probability level.

Results and Discussion: The results of this study showed that drought and salinity stress decreased the quality of crested wheatgrass masses, and reduced the level of quality varied among the masses. Throughout the experiment, 'Sabzevar' and 'Damavand' under drought conditions and 'Sabzevar', 'Arak' and 'Damavand' under salinity conditions maintained higher Turf quality compared with other genotypes. Total chlorophyll content of 'Sabzevar' and 'Damavand' were higher than other genotypes under drought and salinity conditions. The maintenance of higher chlorophyll content has been associated with better drought and salinity tolerance in plant. The soluble sugar content of 'Sabzevar' and 'Damavand' under drought conditions and 'Sabzevar', 'Arak' and 'Damavand' under salinity conditions were higher than other genotypes during the experiment. Soluble sugar content is an important compatible osmolyte in plants. Increased accumulation of soluble sugar content in stressed plants may be an adaptation process and resistance strategy to abiotic stresses in plants. Throughout the experiment, 'AEKQI', 'Sabzevar' and 'Damavand' genotypes under drought conditions and 'Sabzevar' genotypes under salinity conditions maintained higher relative water content in compared with other genotypes. Higher RWC indicates the ability of the leaf to maintain its higher water content

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Associate Professors, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, respectively.

4- Assistant Professor, Department of Horticulture, University College Of Abureyhan - University Of Tehran, Iran

5- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(* - Corresponding Author Email: etemadin@cc.iut.ac.ir)

under stress conditions with the simultaneous capability of the root system to take up adequate water. Based on morphological and physiological analysis for drought and salinity tolerance in investigated genotypes, the tolerance ranking would appear to be 'Sabzevar' > 'Damavand' > 'Arak' > 'Urmia' = Takestan > 'Hashtgerd' under drought stress and 'Sabzevar' > 'Arak' > 'Damavand' > 'Takestan' = 'Hashtgerd' > 'Urmia' under salinity stress. The results of this study showed that 'Sabzevar' and 'Damavand' genotypes had good tolerance to drought stress, and 'Sabzevar' and 'Arak' genotypes had good tolerance to salt stress than other Iranian crested wheatgrass genotypes.

Keywords: *Agropyron cristatum*, Drought, Grass, Salinity



بررسی اثر تیمار گرمائی و قارچ کش بر کنترل آلودگی کشت درون شیشه‌ای سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.)

سیده مهدیه خرازی^۱ - علی تهرانی فر^{۲*} - احمد شریفی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۱

چکیده

موفقیت در تکنیک کشت بافت، به خصوص در رابطه با گیاهان سوخ‌دار، به میزان کنترل آلودگی میکروبی در طی دوره کشت وابسته می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف نظیر تیمار گرمایی و کاربرد قارچ کش‌های مختلف می‌تواند به کنترل آلودگی میکروبی و به دنبال آن، افزایش درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها کمک نماید. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تیمار گرمایی و کاربرد قارچ کش بنومیل بر کاهش آلودگی کشت درون شیشه‌ای گیاه نرگس، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ عامل شامل غلظت قارچ کش بنومیل در محیط کشت (یک و دو در هزار)، اعمال و یا عدم اعمال تیمار گرمایی (۲ سطح) با ۱۰ تکرار انجام شد. به منظور اعمال تیمار گرمایی از آب گرم ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده گردید. از محیط کشت پایه MS تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) برای کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی استفاده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با وجود آنکه کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال تیمار گرمایی و کاربرد دو گرم در لیتر بنومیل حاصل شد، ولی با این حال بیشترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز در این تیمار مشاهده شد که منجر به کاهش پتانسیل بازاریابی ریزنمونه‌ها شد. لذا با در نظر گرفتن درصد قهوه‌ای شدن، درصد بازاریابی و درصد آلودگی ریزنمونه‌ها، عدم اعمال تیمار گرمایی و کاربرد محیط کشت حاوی یک گرم در لیتر قارچ کش بنومیل جهت کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی گیاه نرگس توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بنومیل، درصد زنده‌مانی، درصد قهوه‌ای شدن، کشت بافت

مقدمه

می‌گردند (۸، ۹ و ۲۲). ضدعفونی ریزنمونه یکی از مراحل بسیار مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر روی ریزنمونه‌ها طی مراحل کشت بافت می‌باشد. به همین علت بهبود روش‌ها و تحقیق در رابطه با شرایط ضدعفونی در کشت درون شیشه‌ای از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است. در واقع، موفقیت پروتوکل‌های کشت بافت گیاهی وابسته به ضدعفونی ریزنمونه است (۲۲). طی انجام ضدعفونی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست دهند و تنها باید آلودگی حذف گردد. بنابراین باید غلظت مواد مورد استفاده و مدت زمان اعمال تیمارهای مورد نظر به طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه تعیین گردد (۹). اندام‌هایی نظیر ریزوم، استولون و سوخ که زیر خاک تشکیل می‌گردند، علائم شدید آلودگی را طی مراحل کشت بافت از خود نشان می‌دهند (۱۴)، که با اعمال تیمارهایی نظیر غلظت‌های بالای مواد ضدعفونی‌کننده و یا افزایش مدت زمان اعمال تیمار ضدعفونی، می‌توان علائم آلودگی را تا حدودی کاهش داد. با این حال با اعمال چنین تیمارهایی، گاهی اوقات آلودگی در سطح بالایی مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد که قارچ‌های عامل آلودگی بدون بروز هیچگونه علائم ظاهری، در داخل

پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت گیاهی برای موفقیت کار از عوامل حیاتی محسوب می‌شود. آلودگی ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها از مهم‌ترین عوامل از بین رفتن گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شوند. از جمله این میکروارگانیسم‌ها باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها می‌باشند (۴). این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر تغذیه رقابت می‌کنند و با افزایش تراکم و تولید ترکیبات سمی سبب افزایش مرگ و میر، نوسان در رشد، نکروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه‌دهی و به طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل از رشد

۱ و ۳- استادیاران، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

۲- استاد، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*)- نویسنده مسئول: (Email: tehranifar2009@yahoo.com)

DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.64767

۳ مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر استریل آبکشی گردیدند. پس از شستشو، سوخ‌ها در داخل پتری دیش روی کاغذ صافی استریل، قرار داده شدند. فلس‌های خارجی سوخ‌ها که در مواجهه با ماده گندزدا آسیب دیده بودند، جدا و سوخ‌ها با استفاده از اسکالپل به صورت شعاعی به هشت قطعه مساوی برش داده شدند، به طوری که هر قطعه دارای بخشی از صفحه پایگاهی بود. سپس قطعات برش خورده به فلس‌های جفتی تقسیم شدند (شکل ۱)، به طوری که از هر سوخ ۳۲ عدد ریزنمونه فلس جفتی بدست آمد. پس از این مرحله، ریزنمونه‌ها با استفاده از یک پنس استریل در روی محیط کشت انتقال داده شدند و با آرایش افقی روی محیط کشت استقرار یافتند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، درب ظروف کشت توسط فویل آلومینیومی بسته شد (۱۴).



شکل ۱- ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس
Figure 1- Narcissus twin scale explants

از محیط کشت پایه MS (۱۷) تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. جهت بررسی اثر غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر کنترل آلودگی شرایط کشت، از قارچ‌کش بنومیل با غلظت یک در هزار و دو در هزار استفاده گردید. بدین منظور قارچ‌کش مورد نظر با غلظت مشخص تهیه گردید و جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردیدند و در زیر هود لامینار به محیط کشت افزوده شدند. همچنین در محیط کشت یاد شده ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به عنوان منبع کربوهیدرات و هشت گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت به کار برده شد. قبل از افزودن آگار، pH محیط کشت در ۵/۷ تنظیم شد و سپس محیط کشت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند و پس از افزودن قارچ‌کش، در ویال‌هایی به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع گردیدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس) در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (تعداد سوخک‌های تشکیل شده،

بافت‌های گیاهی قرار دارند که پس از کشت، این علائم ظاهر می‌شوند. بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که روش‌های دیگر نظیر اعمال تیمار حرارتی جهت کنترل آلودگی داخلی بافت‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد (۱۳).

جهت کشت درون‌شیشه‌ای نرگس از قسمت‌های مختلف این گیاه به عنوان ریزنمونه استفاده شده است (۱۱). اما بهترین ریزنمونه قطعات فلس جفتی یا قطعات کوچک برش خورده سوخ می‌باشد. با این حال، آلودگی میکروبی بافت‌ها یا ارگان‌هایی که زیر زمین تشکیل می‌شوند (مانند سوخ‌ها) یک مشکل جدی برای کشت درون‌شیشه‌ای آنها می‌باشد (۲۰). با استفاده از تیمارهای شدید ضدعفونی سطحی با کمک اتانول یا هیپوکلریت سدیم و یا محیط کشت حاوی قارچ‌کش، می‌توان آلودگی را تا حدودی حذف کرد (۶). از آنجایی که آلودگی طی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای نرگس، یکی از موانع تکثیر این گیاه زینتی می‌باشد و باعث از بین رفتن تعدادی و یا گاهی تمامی کشت‌ها می‌گردد، لذا این تحقیق با هدف حذف و یا کاهش آلودگی ریزنمونه‌های گیاه نرگس به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه زینتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد انجام شد. سوخ نرگس شهبلا (*Narcissus tazetta* L.) بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه، از گلخانه‌ای در شهرستان کاشمر جمع‌آوری گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه، به منظور ضدعفونی مواد گیاهی، ابتدا فلس‌های آسیب دیده و آلوده حذف گردیدند و سپس سوخ‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع‌شوینده رایج شستشو داده شدند تا گرد و غبار و همچنین مواد زائد دیگر از سطح آن برطرف گردد. به منظور اعمال تیمار حرارتی، پس از این مرحله سوخ‌ها به دو گروه تقسیم شدند. در گروه اول، تیمار حرارتی اعمال نگردید و در گروه دوم تیمار حرارتی ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت با استفاده از دستگاه بن‌ماری اعمال گردید. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه برای از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی استفاده گردید و پس از انتقال بشر حاوی سوخ‌ها به زیر هود لامینار و آبکشی با آب مقطر استریل، برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. به منظور کاهش کِشش سطحی و افزایش سطح تماس سوخ و ماده ضدعفونی‌کننده، بسته به حجم محلول، ۲ تا ۳ قطره توئین ۲۰ به محلول ضدعفونی‌کننده اضافه شد. طی مدت ضدعفونی و به منظور بهبود تماس گیاه با ماده گندزدا، محلول با دست تکان داده شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت بنومیل و تیمار گرمایی و اثرات متقابل آنها بر درصد باززایی ریزنمونه‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). افزایش غلظت بنومیل در محیط کشت و همچنین اعمال تیمار گرمایی تأثیر منفی بر باززایی ریزنمونه‌ها داشت، به طوری که بیشترین میانگین این صفت (۹۳ درصد) در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی یک گرم در لیتر بنومیل و شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی حاصل شد. در حالی که کاربرد تیمار گرمایی و استفاده از محیط کشت حاوی دو گرم در لیتر بنومیل منجر به کمترین درصد باززایی (۳۲ درصد) در ریزنمونه‌ها گردید (شکل ۲).

درصد باززایی ریزنمونه‌ها، درصد آلودگی باکتریایی، درصد آلودگی قارچی، درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل (۲×۲) با ۲ عامل، شامل غلظت قارچ کش بنومیل در محیط کشت (۲ سطح)، اعمال و یا عدم اعمال تیمار گرمایی (۲ سطح)، با ۱۰ تکرار انجام شد. آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD انجام شد و در نهایت با استفاده از برنامه Excel نمودارهای مربوط به آنها رسم گردید.

نتایج و بحث

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت قارچ کش و تیمار گرمایی بر کنترل آلودگی کشت درون شیشه‌ای
فلس جفتی نرگس

Table 1- ANOVA (Mean Square) of fungicide concentration and heat treatment on contamination control of *Narcissus tazetta* twin scale explants *in vitro*

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد پیازچه Bulblet number	قطر پیازچه Bulblet diameter	قهوه ای شدن Browning (%)	آلودگی Contamination (%)	باززایی Regeneration (%)
غلظت قارچ کش Benomyl concentration (A)	1	1.22 ns	0.001 ^{ns}	5487.31 **	1775.55 **	5487.31 **
تیمار گرمائی Heat treatment (B)	1	4.90 **	0.009 ns	14231.76 **	381.30 **	14231.76 **
A × B	1	0.62 ns	0.001 ns	752.56 **	2333.25 **	752.56 **
خطا Error	36	0.698	0.009	15.34	13.35	15.34

ns و * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی دار.

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

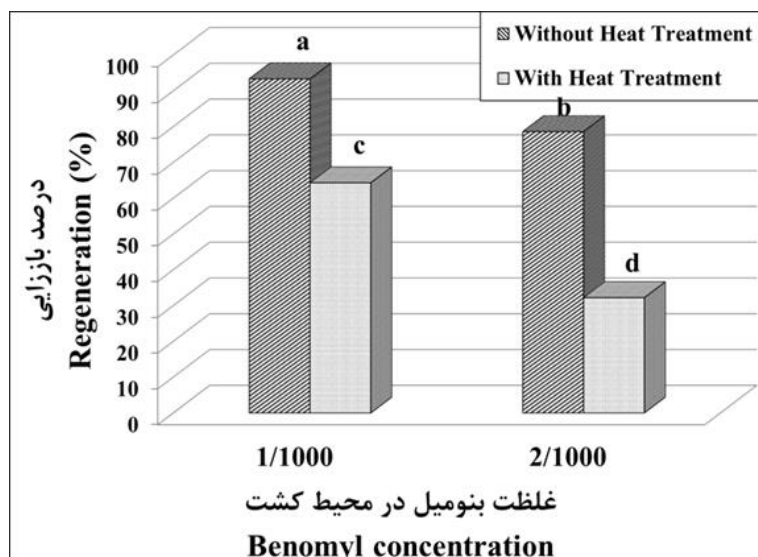
در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی، سوخک‌های به نسبت قطورتری (با قطر ۰/۷۲ میلی‌متر) تشکیل گردید (شکل ۵ و شکل ۶-ب). میزان مقاومت گیاه به تیمار گرمایی، بستگی به شرایط فیزیولوژیکی گیاه نظیر اندازه و محتوای رطوبت گیاه، قدرت رشد، وضعیت لایه‌های خارجی، میزان درجه حرارت در هنگام رشد، سطح رکود و خواب، سن و ساختار ژنتیکی گیاه دارد. در پژوهش انجام شده روی گیاه لیلیوم مشخص گردید که اعمال تیمار گرمایی ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، باعث قهوه‌ای شدن و تأخیر در باززایی ریزنمونه‌ها گردید. همچنین اعمال این تیمار تأثیر منفی بر تعداد سوخک باززایی شده داشت و درصد باززایی ریزنمونه‌ها نیز به میزان ۲۵ درصد کاهش یافت، درحالی‌که اعمال تیمارهای گرمایی ۴۰ تا ۴۴ درجه سانتی‌گراد تأثیر منفی بر میزان باززایی ریزنمونه‌ها نداشت (۱۵). لذا انتخاب دمای مناسب با توجه به میزان حساسیت بافت گیاهی جهت انتخاب صحیح تیمار گرمایی اهمیت ویژه‌ای دارد. درصد آلودگی که شامل آلودگی باکتریایی و قارچی می‌باشد،

از سوی دیگر محاسبه درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نشان داد که تأثیر تیمارها بر این صفت نیز معنی‌دار بود. اعمال تیمار گرمایی و کاربرد بنومیل با غلظت دو گرم در لیتر، تأثیر شدیدی بر افزایش درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت و بیشترین میانگین در این تیمار حاصل شد، در صورتی که عدم کاربرد تیمار گرمایی و کاهش غلظت بنومیل در محیط کشت به میزان یک گرم در لیتر باعث کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید (شکل ۳).

بر اساس نتایج به دست آمده اثر تیمار گرمایی بر تعداد سوخک باززایی شده معنی‌دار بود، به طوری که کاربرد تیمار گرمایی تأثیر منفی بر تعداد سوخک باززایی شده داشت و باعث کاهش ۲۵ درصدی این صفت در مقایسه با شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی شد. در واقع با اعمال تیمار گرمایی پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد که در نتیجه منجر به کاهش ۲۷ درصدی تعداد سوخک باززایی شده می‌گردد (شکل ۴). اندازه‌گیری قطر سوخک‌های باززایی شده نشان داد که تیمار گرمایی تأثیر معنی‌داری بر این صفت نداشت ولی با این حال

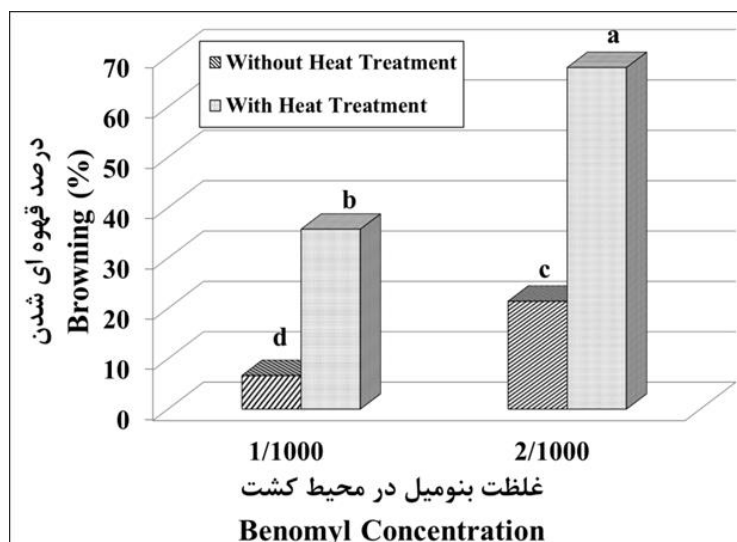
داشت. از سوی دیگر، کمترین درصد آلودگی (۷ درصد) در شرایط اعمال تیمار گرمایی و محیط کشت حاوی ۲ گرم در لیتر بنومیل حاصل شد. همچنین بین غلظت‌های یک و دو گرم در لیتر بنومیل در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

پارامتر مهمی در این پژوهش محسوب می‌گردد. نتایج مندرج در شکل ۷ نشان می‌دهد که در ریزنمونه‌های فلس جفتی کشت شده در محیط کشت حاوی ۱ گرم در لیتر بنومیل و اعمال تیمار گرمایی، بیشترین درصد آلودگی مشاهده شد که شامل ۲۱ درصد آلودگی قارچی و ۱۴ درصد آلودگی باکتریایی بود و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها



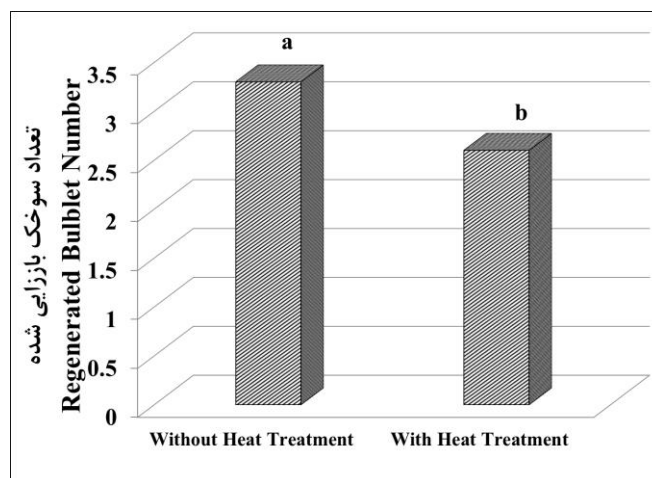
شکل ۲- اثر متقابل تیمار گرمایی × غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر درصد باززایی ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 2- Interaction effects of heat treatment × fungicide concentration on regeneration (%) of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)



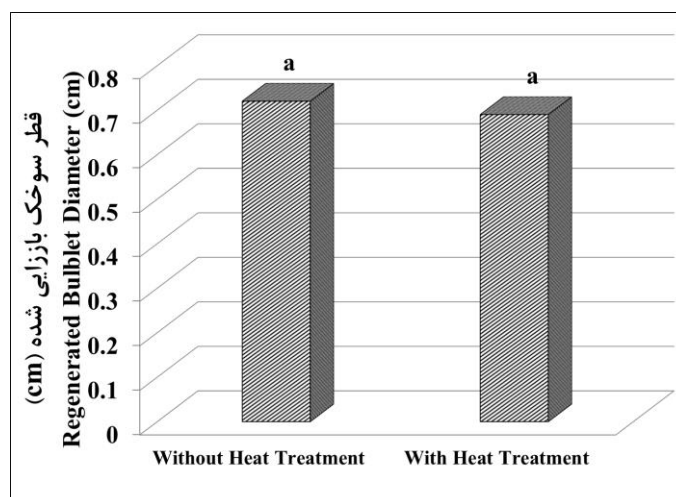
شکل ۳- اثر متقابل تیمار گرمایی × غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 3- Interaction effect of heat treatment × fungicide concentration on browning (%) of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۴- اثر تیمار گرمایی بر تعداد سوخک باززایی شده ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 4- Effect of heat treatment on regenerated bulblet number of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)



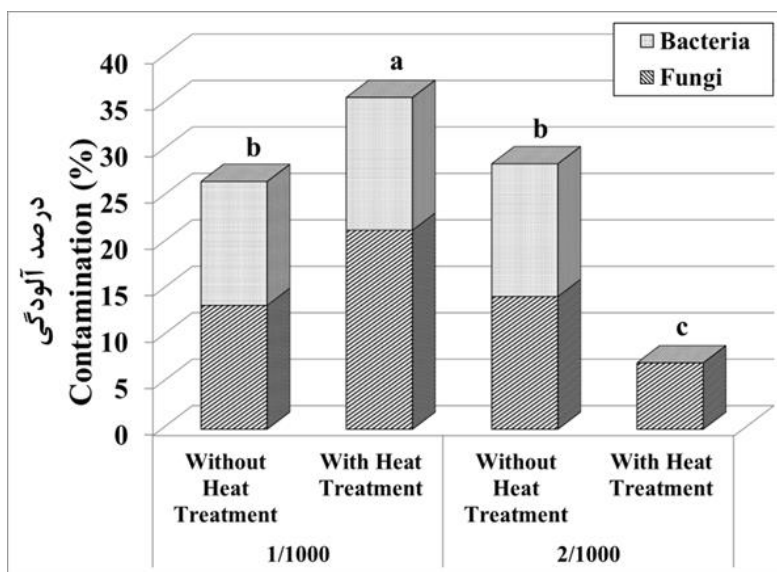
شکل ۵- اثر تیمار گرمایی بر قطر سوخک باززایی شده ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 5- Effect of heat treatment on regenerated bulblet diameter of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۶- الف: مراحل اولیه تشکیل سوخک از ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس، ب: سوخک‌های تشکیل شده از ریزنمونه فلس جفتی در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی

Figure 6- A: Early stages of bulblet formation from Narcissus twin scale explants. B: Bulblet formation from Narcissus twin scale explants, in the absence of heat treatments. (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۷- اثر متقابل تیمار گرمایی × غلظت قارچ کش در محیط کشت بر درصد آلودگی ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس
Figure 7- Interaction effect of heat treatment × fungicide concentration on contamination (%) of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)

فلسی حدود ۵۰ درصد بود و اعمال تیمار گرمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، تاثیر بسیار مطلوبی بر کاهش میزان آلودگی در شرایط کشت بافت داشت (۱۵). در رابطه با ریزنمونه‌های گیاه نرگس نیز، اعمال تیمار گرمایی ۵۴ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش آلودگی داخلی بافت‌ها از ۴۰ تا ۶۰ درصد به ۵ درصد گردید (۱۳). گاهی اوقات بعد از اعمال تیمار گرمایی، میزان آلودگی افزایش می‌یابد. در رابطه با گیاه لیلیوم، با اعمال یک ساعت تیمار گرمایی ۴۴ درجه سانتی‌گراد، میزان آلودگی نسبت به تیمار گرمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. در واقع بعد از اعمال تیمار دمایی بالا، به علت آسیب بافت‌ها، پاتوژن‌های باقی مانده ممکن است به آسانی از بافت آزاد گردند. همچنین دمای بالا، اسپور پاتوژن‌های موجود در بافت را فعال کرده و در نتیجه باعث افزایش آلودگی می‌گردد (۱۵). با توجه به اینکه مطالعات انجام شده در رابطه با تأثیر تیمار گرمایی بر روی کاهش آلودگی میکروبی ریزنمونه‌ها، محدود به سال‌های ۱۹۱۴ تا ۱۹۹۷ می‌باشد و پس از آن متوقف شده است (۱۲ و ۱۵)، لذا چنین به نظر می‌رسد که اعمال این تیمار جهت کنترل آلودگی میکروبی کارایی لازم را ندارد. در پژوهش حاضر نیز اعمال تیمار گرمایی باعث آسیب به بافت‌های فلس گردید و درصد باززایی ریزنمونه‌ها کاهش یافت.

نتیجه‌گیری

کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی، به خصوص در رابطه با گیاهان سوخ‌دار که در تماس مستقیم با بستر کشت می‌باشند، یکی از مراحل

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌تواند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نماید (۷ و ۱۸)، و بر اساس تحقیقات انجام شده، مؤثرترین تیمار در مقابل آلودگی قارچی، قارچ‌کش بنومیل می‌باشد (۱). از آنجایی‌که این قارچ‌کش، جزو قارچ‌کش‌های سیستمیک محسوب می‌گردد، لذا جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد (۱۶). اسمیت (۲۱) گزارش نمود استفاده از تیمارهای قارچ‌کش (نظیر بنومیل با غلظت ۰/۵ درصد) قبل از کشت نمونه‌ها، می‌تواند به کاهش آلودگی قارچی کمک نماید. آلتان و همکاران (۳) از تیمارهای شیمیایی مختلفی برای کنترل آلودگی میکروبی در کشت درون شیشه‌ای لیلیوم استفاده کردند و بهترین پاسخ را پس از اعمال ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بنومیل به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده نمودند. نتایج مشابهی نیز توسط بارنت و مک‌گیلوری (۵) و آلن و همکاران (۲) گزارش شده است. هالدمن و همکاران (۱۰) نشان دادند کاربرد محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر بنومیل باعث حذف کامل آلودگی از ریزنمونه‌های گیاه کاملیا گردید. در محلول آبی، بنومیل به دو ترکیب متیل ۲-بنزیمیدازول کاربامات و بوتیل ایزوسیانات شکسته می‌شود که هر دو در مقابل قارچ موثر می‌باشند (۱۹). مکانیزم عمل بنومیل از طریق جلوگیری شدید از سنتز DNA و یا فرایندهای مرتبط با تقسیم سلولی قارچ‌ها می‌باشد (۱۹ و ۲۳).

مطالعات نشان می‌دهد که کاربرد تیمار گرمایی نیز می‌تواند در کنترل آلودگی میکروبی در شرایط کشت درون شیشه‌ای مؤثر باشد (۱۳ و ۱۵). در پژوهش انجام شده روی گیاه لیلیوم مشخص گردید که در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی، میزان آلودگی ریزنمونه‌های

تیمار گرمایی و کاربرد دو گرم در لیتر بنومیل حاصل شد، ولی با این حال بیشترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز در این تیمار مشاهده شد که منجر به کاهش پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها شد. لذا با در نظر گرفتن درصد قهوه‌ای شدن، درصد باززایی و درصد آلودگی ریزنمونه‌ها، عدم اعمال تیمار گرمایی و کاربرد محیط کشت حاوی یک گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل جهت کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی گیاه نرگس توصیه می‌گردد.

اساسی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف از جمله تیمار گرمایی و کاربرد قارچ‌کش‌ها نظیر بنومیل در محیط کشت می‌تواند به کنترل آلودگی میکروبی سوخ نرگس شهلا کمک نمایند. با این حال اعمال چنین تیمارهایی می‌تواند تأثیر منفی بر پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها داشته باشد، لذا انتخاب تیمار مناسب به نحوی که باعث کنترل آلودگی میکروبی و از سوی دیگر حفظ پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها گردد، حائز اهمیت می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با وجود آنکه کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال

منابع

- 1- Ahmadi E., Nasr S.M.H., Jalilvand H., and Savadkoobi S.K. 2012. Contamination control of microbe *Ziziphus spina christi* seed *in vitro* culture. *Trees* 26(4): 1299-1304.
- 2- Allen T.W., Enebak S.A., and Carey W.A. 2004. Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed. *Crop Protection* 23(10): 979-982.
- 3- Altan F., Burun B., and Sahin N. 2010. Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology* 9(7): 991-995.
- 4- Bairu M.W., and Kane M.E. 2011. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Regulation* 63(2): 101-103.
- 5- Barnett J.P., and McGilvray J.M. 2002. Reducing seed and seedlings pathogens improves longleaf pine seedlings production. In: Gen. Tech. Rep. SRS-56. Asheville, NC: US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. 19-20.
- 6- Cohen D., and Whitehead H.C.M. 1987. Micropropagation of high health Narcissus and Iris. Comm. Rep. 14. Plant Physiol. Div. DSIR. Plamerston North. New Zealand.
- 7- Eed A.M., Reddy S.A., Reddy K.M., da Silva J.A.T., Reddy P.V., Beghum H., and Venkatsubbaiah P.Y. 2010. Effect of antibiotics and fungicides on the *in vitro* Production of *Citrus limonia* Osbeck Nodal Segment and Shoot Tip Explants. *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 4(1): 66-70.
- 8- Ghazi Motlagh Z., Tehranifar A., Arouei H., and Jahanbakhsh V. 2012. Investigation the effect of several essential oils and parabens on reducing the infection of media culture and growth, development of *Malus domestica* and *Chrysanthemum marifolium* *in vitro* condition. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
- 9- Goran A., Mozaffari A.A., and Ghaderi N. 2013. Investigation the effect of different antimicrobial compounds on surface sterilization of grape (*Vitis vinifera* L.) explants during *in vitro*. The sixth congress of Agricultural research findings. Kurdistan University. (In Persian)
- 10- Haldeman J.H., Thomas R.L., and McKamy D.L. 1987. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. *HortScience* 22(2): 306-307.
- 11- Hanks G.R. (Ed.). 2003. Narcissus and daffodil: the genus *Narcissus*. CRC press.
- 12- Hewitt T.R. 1914. Eelworms in *narcissus* bulbs. *Journal of the Department of Agriculture and Technical Instruction for Ireland* 14: 345-353.
- 13- Hol G.M.G.M., and van der Linde P.C.G. 1992. Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 75-79.
- 14- Kharrazi M., Tehranifar A., Nemati H., and Bagheri A. 2016. Investigation of different methods of *Amaryllis (Hippeastrum × johnsonii)* culturing and propagation for increasing the proliferation rate during *in vitro* and greenhouse conditions. Ph.D. Dissertation. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
- 15- Langens-Gerrits M., Albers M., and De Klerk G.J. 1997. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*. In *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Springer Netherlands. 219-224.
- 16- Mng'omba S.A., du Toit E.S., Akinnifesi F.K., and Sileshi G. 2012. Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. Intech open Access Publisher.
- 17- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- 18- Niedz R.P., and Bausher M.G. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 38(5): 468-471.
- 19- Pence V.C. 2005. *In vitro* collecting (IVC). I. The effect of collecting method and antimicrobial agents on

- contamination in temperate and tropical collections. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41(3): 324-332.
- 20- Sharifi A., Moshtaghi N., and Bagheri A.R. 2010. Applied Plant Tissue Culture. First Edition, Jahad-e-daneshgahi publication, Mashhad. (In Persian)
- 21- Smith R.H. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
- 22- Taghi Zadeh M., Selgi M., and Shahrjerdi I. 2015. Antimicrobial effects of natural essential oils for surface sterilization of strawberries. *Journal of Medicinal Plants* 4(3): 311-318. (In Persian)
- 23- Vyas S.C. 1993. Handbook of systemic fungicides: compounds. Tata McGraw-Hill.



The Effect of Heat Treatment and Fungicide on Controlling the Infestation of *Narcissus tazetta* L. *In Vitro* Culture

M. Kharrazi¹- A. Tehranifar^{2*}- A. Sharifi³

Received: 20-08-2017

Accepted: 21-01-2019

Introduction: Success in tissue culture technique, especially in bulbous plants, depends on the microbial contamination control during *in vitro* culture. Applying different treatments, such as heat treatment and usage of fungicides, can control the microbial contamination and consequently increase the percentage of explant survival.

Materials and Methods: This study aimed to investigate the effect of heat treatment and fungicide on reducing the contamination during *in vitro* culture of narcissus. So, an experiment was done as a factorial experiment in a completely randomized design with two factors, including benomyl concentration in the medium (1 and 2 g/l) and heat treatments (two levels, with and without heat treatment), with 10 replications. In order to sterilizing the plant materials, damaged and infected scales were removed firstly and then bulbs were washed for 30 minutes with running tap water and a few drops of dishwashing liquid. For applying heat treatment, bulbs were divided into two groups. In the first group, heat treatment was not applied and in the second group heat treatment 54 °C was applied for one hour using water bath. After this step, bulbs surface were sterilized by dipping in 70% ethanol for one minute and rinsed with sterile distilled water, followed by immersing in 1.5% sodium hypochlorite solution for 30 min. After sterilization with sodium hypochlorite solution, bulbs were washed three times with sterile distilled water under laminar air flow hood. After sterilization step, bulbs were cut into 32 twin scales explants and cultured in MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.2 mg/l NAA + benomyl (1 or 2 g/l). After 30 days, the response of explants (number of produced bulbs, percentage of explant survival, percentage of bacterial contamination, percentage of fungal contamination, percentage of browning) was evaluated. Data preparation was done in the Excel program and data analysis was done using JMP-8 software. Mean comparison of the treatments was done by LSD test and finally the charts were drawn using the Excel program.

Results and Discussion: The results showed that increasing the concentration of benomyl in the medium and applying heat treatment had negative effect on regeneration potential of explants, so that the maximum regeneration mean were observed when heat treatment was not applied for explants and medium contains 1 g/l benomyl. Using the heat treatment and application of 2 g/l benomyl in the medium leads to the lowest regeneration amount. On the other hand, evaluating the browning percentage of explants showed that the effect of treatments was significant in this trait. Applying the heat treatment and using 2 g/l benomyl in the medium had severe effect on the increasing of explant browning and the maximum mean was observed in this treatment. But reducing the benomyl concentration in the medium and none application of heat treatment caused the lowest amount of explant browning. Contamination percentage that includes bacterial and fungal contamination is an important parameter in this study. Explants that cultured in the medium containing 1 g/l benomyl and applying heat treatment showed the highest contamination percentage, which contains 21% fungal and 14% bacterial contamination. The lowest percentage of contamination was observed when heat treatment applied and medium contains 2 g/l benomyl. However, this treatment caused the highest percentage of explant browning that lead to reduction of explants regeneration potential. Researches showed that the use of fungicides can help to control tissue culture contamination and according to previous studies, benomyl is the most effective treatment against fungal infection. As benomyl is considered as a systemic fungicide, so it is useful to eliminate the internal fungus. On the other hand, there are some reports about the positive effect of heat treatment on the control of tissue culture contamination. As regards this investigations were done in 1914 to 1997 and then stopped, so it seems that application of this treatment had no sufficient efficiency for contamination control during *in vitro* condition.

1 and 3- Assistant Professors, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(* - Corresponding Author Email: tehranifar2009@yahoo.com)

Conclusion: Therefore, by considering the browning, regeneration and contamination percentage, non-application of heat treatment and usage of 1g/l benomyl fungicide in the medium for in vitro culture of Narcissus twin scales explants is recommended.

Keywords: Benomyl, Percentage of survival, Percentage of browning, Tissue culture



ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد کمی و کیفی گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) تحت تأثیر تراکم گیاهی و کاربرد کود شیمیایی اوره و کودهای آلی مختلف

محمد بهزاد امیری^{۱*} - پرویز رضوانی مقدم^۲ - محسن جهان^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

به منظور بررسی اثر کودهای آلی و شیمیایی بر خصوصیات کمی گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) در تراکم‌های مختلف گیاهی، آزمایشی در سال‌های زراعی ۹۲-۱۳۹۰ در دانشگاه فردوسی مشهد به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ۳ تراکم گیاهی (۳، ۵ و ۱۰ بوته در متر مربع) و ۵ نوع کود مختلف (کمپوست زباله شهری، ورمی کمپوست، گاوی، شیمیایی (وره) و شاهد) بودند. نتایج آزمایش نشان داد که با کاهش تراکم گیاهی، تأثیر کودهای آلی در افزایش عملکرد گل تشدید شد و در کمترین تراکم گیاهی، کودهای کمپوست زباله شهری، ورمی کمپوست و گاوی، عملکرد گل را به ترتیب ۱۱۲، ۷۹ و ۲۲۳ درصد نسبت به شاهد بطور معنی‌داری افزایش دادند. در تمامی تراکم‌های مورد مطالعه، طول ساقه فرعی در شرایط استفاده از کودهای آلی نسبت به شاهد بطور معنی‌داری بیشتر بود. کودهای کمپوست، ورمی کمپوست، گاوی و شیمیایی (وره) در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع به ترتیب افزایش ۱۰۶، ۵۴، ۶۶ و ۱۷۳ درصدی میزان فنول کل را در مقایسه با شاهد سبب شدند. در تراکم متوسط گیاهی (۵ بوته در متر مربع) استفاده از کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به ترتیب منجر به افزایش ۸۳، ۷۴ و ۵۷ درصدی میزان آنتوسیانین کل نسبت به شاهد شدند. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از کودهای آلی مختلف و کود شیمیایی اوره در تراکم‌های مطلوب گیاهی می‌تواند منجر به بهبود خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد کمی و کیفی گاوزبان ایرانی شود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین کل، فنول کل، کمپوست، گیاه دارویی، نهاده بوم‌سازگار

مقدمه

ضدمیکروبی دارند (۵۳) و منجر به افزایش ظرفیت ایمنی سلول‌ها می‌شوند (۳۰). این گیاه در مناطق شمالی کشور در دامنه‌های رشته کوه‌های البرز از گلستان تا اردبیل و استان قزوین و در دامنه‌های رشته کوه‌های البرز به صورت خودرو پراکنش دارد (۶۶).

جهت استفاده مطلوب‌تر از عوامل محیطی نظیر نور، آب، مواد غذایی و نیز جلوگیری از بروز رقابت شدید، تعداد بوته در واحد سطح باید در حد بهینه باشد (۵۸). تراکم بوته مطلوب تراکمی است که در نتیجه‌ی آن کلیه‌ی عوامل محیطی به‌طور مؤثر مورد استفاده گیاه قرار گرفته و در عین حال رقابت‌های درون‌بوته‌ای و بین‌بوته‌ای در حداقل باشند تا حداکثر عملکرد ممکن با کیفیت مطلوب بدست آید (۱۶). تراکم بوته به‌عنوان یک عامل زراعی تحت کنترل، نقش مؤثری در عملکرد محصولات مختلف ایفا می‌کند و مشخص نمودن تراکم گیاهی از اصول اولیه‌ی زراعت هر محصول به شمار می‌رود (۳۴). اثر آرایش کاشت و تراکم بوته بر عملکرد گاوزبان ایرانی نشان داد که بیشترین میانگین وزن خشک گل در واحد سطح در آرایش کاشت

در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی و معطر افزایش قابل توجهی یافته و تقاضا برای این گونه‌ها در صنایع مختلف از قبیل داروسازی، آرایشی و بهداشتی و صنایع غذایی همچنان رو به افزایش است. گاوزبان ایرانی با نام علمی (*Echium amoenum*) گیاهی چند ساله و متعلق به خانواده‌ی گاوزبان^۴ می‌باشد و در طب سنتی ایران از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (مهربانی). عصاره‌ی گلبرگ‌های این گیاه تسکین‌دهنده، ضدالتهاب و ضد درد هستند و خاصیت

۱- استادیار گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی گناباد

۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشیار گروه آگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

فردوسی مشهد

(*) نویسنده مسئول: (Email: amiri@gonabad.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.70323

4- Boraginaceae

مربعی و تراکم ۶ بوته در متر مربع حاصل شد (۱۳). پس از بررسی عملکرد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L. تحت تأثیر تراکم بوته (۶، ۱۰، ۱۴ و ۱۸ بوته در متر مربع) و تاریخ‌های مختلف کاشت (۱۵ مهر، ۵ آبان، ۲۵ آبان، ۱۵ آذر و ۵ دی) گزارش شد، بیشترین عملکرد دانه و عملکرد روغن در تاریخ کاشت ۵ آبان و تراکم ۱۰ بوته در متر مربع و بیشترین کلروفیل a و کلروفیل کل در تاریخ کاشت ۱۵ مهر و تراکم ۱۴ بوته در متر مربع بدست آمد (۲۹). در پژوهشی اثر تراکم بوته بر عملکرد و میزان اسانس آنیسون (*Pimpinella anisum* L.) بررسی و گزارش شد که بیشترین عملکرد زیست‌توده و عملکرد دانه به‌ترتیب در تراکم‌های ۵۰ و ۲۵ بوته در متر مربع بدست آمد، ضمن اینکه تراکم ۲۵ بوته در متر مربع دارای بیشترین میزان اسانس نسبت به سایر تیمارها بود (۳۳)، احتمالاً در این تراکم، رقابت درون‌گونه‌ای به حداقل رسیده و گیاه توانسته از امکانات محیطی بهره‌برداری مطلوب‌تری داشته باشد و در نتیجه میزان اسانس افزایش یافته است. در پژوهشی دیگر، پس از بررسی اثر تراکم‌های مختلف (۱۲/۵، ۱۶/۶ و ۲۵ بوته در متر مربع) بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) گزارش شد که بیشترین تعداد چتر در بوته و ماده‌ی خشک تولیدی در تراکم ۱۲/۵ بوته در متر مربع مشاهده شد و تراکم ۲۵ بوته در متر مربع دارای بیشترین ارتفاع بوته بود (۲۶).

با توجه به استفاده روزافزون از گیاهان دارویی در سطح جهان، اهمیت کشت و پرورش گیاهان دارویی به‌ویژه در سیستم‌های اکولوژیک، بیشتر آشکار می‌شود. کاربرد وسیع نهاده‌های دخیل در امر تولید جهت دستیابی به عملکرد بالا، از یک طرف، و لزوم عاری بودن گیاهان دارویی از بقایای مواد شیمیایی در طی مراحل تولید، فرآوری و عرضه آنها، از طرف دیگر، ضرورت کاربرد نهاده‌های بوم‌سازگار در تولید این گیاهان را بیش از پیش نمایان می‌سازد (۲۱). لذا، به‌نظر می‌رسد حتی اگر عملکرد این گیاهان در نتیجه‌ی استفاده از نهاده‌های طبیعی، کمتر و یا برابر با عملکرد آنها در نتیجه مصرف کودهای شیمیایی باشد، تولید این گیاهان با استفاده از نهاده‌های طبیعی نظیر کودهای آلی، راه‌حل مناسبی برای تولید و عرضه داروهای گیاهی سالم باشد. کودهای دامی حاوی مقدار زیادی ماده‌ی آلی هستند و یکی از منابع اولیه نیتروژن به‌شمار می‌روند و در بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک نقش کلیدی دارند (۴۶). بر اساس گزارش برخی محققین، مصرف کود گاوی کاملاً پوسیده، تعداد بذر در بوته زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) را از ۲۹۶ به ۳۶۴ بذر افزایش داد (۳). در یک پژوهش، پس از بررسی اثر کودهای آلی مختلف بر شاخص‌های کمی و کیفی گیاه دارویی بابونه‌ی آلمانی (*Matricaria recutita*) گزارش شد که گیاهان تیمار شده با کود گاوی دارای بیشترین عملکرد گل خشک بود و بیشترین عملکرد اسانس و مقدار کامازولین به‌ترتیب در گیاهان تحت تیمارهای کود گاوی و کمپوست

بدست آمد (۲۳). کمپوست زباله شهری نوعی کود آلی است که دارای بیشتر عناصر غذایی اصلی مورد نیاز گیاه بوده و در ضمن باعث کاهش سطوح آلاینده‌ها، بهبود ساختار خاک و افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی و ترکیبات هیومیک خاک می‌شود (۲۷ و ۵۷). در پژوهشی، اثر سطوح مختلف کمپوست زباله شهری بر عملکرد و اجزای عملکرد سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) بررسی و گزارش شد که با افزایش مقادیر مصرفی کمپوست از صفر به ۱۵ تن در هکتار، تعداد و وزن دانه در بوته افزایش یافت، ولی افزایش بیشتر کمپوست مصرفی (از ۱۵ به ۳۰ تن در هکتار) کاهش تعداد و وزن دانه در بوته را به همراه داشت (۵). در آزمایشی دیگر، پس از بررسی اثر کوه‌های آلی و شیمیایی مختلف روی گیاه دارویی اسفرزه (*Plantago ovata*) مشاهده شد که کاربرد کمپوست در اکثر صفات مورد مطالعه نسبت به کود شیمیایی دارای برتری بود، به‌طوری‌که بیشترین ارتفاع بوته، وزن دانه در بوته و ماده‌ی خشک تولیدی در تیمار ۸ تن در هکتار کمپوست بدست آمد (۳۷). ورمی‌کمپوست‌ها موادی هستند که در نتیجه‌ی فعالیت گونه‌ای از کرم‌های خاکی^۱ بر روی ضایعات شهری، صنعتی و کشاورزی تولید (۶۵) و غنی از هورمون‌های رشد و ویتامین‌ها بوده و به‌عنوان یک آفت‌کش زیستی و اصلاح‌کننده‌ی آلی خاک استفاده می‌شود (۵۵ و ۵۶). استفاده از ورمی‌کمپوست به نسبت حجمی ۳۰ درصد، منجر به تولید بیشترین میزان آنتوسیانین در گاوزبان ایرانی شد (۲۴). برخی محققین (۱) گزارش کردند که کاربرد ورمی‌کمپوست، بر میزان غلظت عناصر کم‌مصرف گاوزبان اروپایی اثر معنی‌داری داشت و با افزایش سطوح کاربرد آن، غلظت عناصر غذایی افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین غلظت عناصر غذایی در شرایط کاربرد ۴۰ کیلوگرم در هکتار ورمی‌کمپوست که در طی سه سال یا بیشتر مصرف شده‌اند، بدست آمد. برخی دیگر از محققین نشان دادند که کاربرد مقادیر متعادل از ورمی‌کمپوست منجر به تولید بیشترین وزن تر و خشک گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) شد (۱۵). بیشترین وزن خشک بوته و عملکرد اسانس گیاه دارویی بادرشی (*Dracocephalum moldavica* L.) در شرایط کاربرد ۲۰ تن کود دامی بدست آمد (۴۴). در پژوهشی دیگر، بیشترین ارتفاع بوته (۶۲/۸۳ سانتی‌متر) و عملکرد زیست‌توده (۹۲۸۱/۷۱ کیلوگرم در هکتار) گیاه دارویی گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) در تیمار کاربرد ۹ تن در هکتار کود دامی مشاهده شد، ولی بیشترین شاخص سطح برگ (۱/۴۲)، عملکرد دانه (۱۳۹۹/۸۴ کیلوگرم در هکتار) و درصد اسانس (۰/۵۶ درصد) در تیمار ۱۲ تن کود دامی در هکتار حاصل شد (۶۰). کاربرد میزان ۶۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیشترین تولید بذر در بوته گاوزبان ایرانی را سبب شد (۴۹). بیشترین تعداد ساقه فرعی، ارتفاع، عملکرد سرشاخه گلدار و عملکرد موسیلاژ و اسانس در گاوزبان اروپایی با مصرف ۵۰

این پژوهش در سال‌های زراعی ۹۱-۱۳۹۰ و ۹۲-۱۳۹۱ در مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۹ درجه و ۳۸ دقیقه شرقی و ارتفاع ۹۸۵ متر از سطح دریا، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل ۳ تراکم کاشت (۳، ۵ و ۱۰ بوته در متر مربع) (به ترتیب با فواصل کاشت ۶۰، ۴۰ و ۲۰ سانتی‌متر روی ردیف) و ۵ نوع کود آلی و شیمیایی (۱- کمپوست، ۲- ورمی کمپوست، ۳- گاوی، ۴- شیمیایی (اوره) و ۵- شاهد) بودند. قبل از انجام آزمایش، از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک نمونه گیری انجام و به منظور تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه ارسال شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است.

درصد کود شیمیایی (اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم) به علاوه کود زیستی (نیتروکسین حاوی ایزتوباکتر و آزوسپیریلیوم) حاصل شد (۳۵). مصرف ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی نیتروژن در شرایط تلقیح بذر با نیتروکسین منجر به تولید بیشترین ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، عملکرد خشک سرشاخه گلدار و عملکرد خشک بوته گاو زبان اروپایی شد (۷۱).

با توجه به کاربردهای متعدد گاو زبان ایرانی در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، به نظر می‌رسد که با تعیین تراکم مناسب بوته و مدیریت صحیح نهاده‌ها می‌توان به عملکرد مطلوب و عاری از بقایای شیمیایی این گیاه دارویی دست یافت، لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر تراکم‌های مختلف گیاهی و کاربرد کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر رشد و عملکرد گاو زبان ایرانی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1- Soil characteristics of experiment place

بافت خاک Soil texture	نیتروژن Nitrogen (mg.kg ⁻¹)	فسفر Phosphorous (mg.kg ⁻¹)	پتاسیم Potassium (mg.kg ⁻¹)	هدایت الکتریکی Ec (dS.m ⁻¹)	pH
لومی سیلتی Silty loam	15.7	13.4	417	1.1	7.3

منابع موجود (۴۹)، نیاز کودی گاو زبان ایرانی برای نیتروژن از منبع شیمیایی (اوره)، ۹۰ کیلوگرم در هکتار تعیین شد که نیمی از این مقدار در زمان کاشت به منظور کمک به رشد سریع گیاهچه و نیم دیگر آن بعد از انجام عملیات تنک برای رفع تنش‌های احتمالی حاصل از تنک و برای کمک به گیاه در مرحله طویل شدن ساقه، به خاک مزرعه اضافه گردید، ضمن اینکه در دومین سال زراعی (۹۲-۱۳۹۱) نیز همین میزان کود شیمیایی طی دو مرحله آغاز رشد مجدد گیاه در سال دوم به منظور افزایش سرعت رشد گیاهچه (سرعت رشد اولیه گیاهچه‌های گاو زبان کم است) و مرحله‌ی چهار برگی (آغاز مرحله طویل شدن ساقه) در اختیار گیاه قرار گرفت.

برای اعمال کودهای آلی، میزان عناصر غذایی هر یک از کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی تعیین (نتایج تجزیه‌ی کودهای آلی مورد استفاده در آزمایش در جدول ۲ آورده شده است) و سپس بر حسب نیاز غذایی گاو زبان ایرانی به ترتیب بر مبنای ۱۰ تن در هکتار کود کمپوست، ۷ تن در هکتار کود ورمی کمپوست و ۳۰ تن در هکتار کود گاوی، در اسفندماه ۱۳۹۰ در سطح کرت‌های مورد نظر به طور یکنواخت پخش و بلافاصله توسط بیل دستی وارد خاک شدند. لازم به ذکر است که در اسفندماه ۱۳۹۱ نیز به منظور تقویت رشد مجدد گیاه و ایجاد شرایط مساعد برای رشد گیاه در سال‌های بعد، همین میزان کود به خاک کرت‌های مربوطه اضافه شد. بر اساس

جدول ۲- خصوصیات کودهای آلی مورد استفاده

Table 2- Characteristics of used organic fertilizers

نوع کود آلی Type of organic fertilizer	نیتروژن Nitrogen (%)	فسفر Phosphorous (%)	پتاسیم Potassium (%)
کمپوست Compost	0.92	0.44	0.49
ورمی کمپوست Vermicompost	1.28	1.53	0.96
کود گاوی Cow manure	0.31	0.29	1.04

کودی بودن ماهیت تیمارها و جلوگیری از اختلاط تیمارها با هم، برای هر بلوک آزمایشی یک جوی آب و پساب جداگانه در نظر گرفته شد. بذور گاو زبان ایرانی با منشاء توده‌ی مشهد از مزرعه‌ی تحقیقاتی

برای آماده‌سازی زمین با تأکید بر عملیات زراعی اکولوژیک، خاکورزی حداقل انجام شد، به این ترتیب که پس از انجام دیسک سبک، کرت‌های آزمایشی با ابعاد ۴/۸×۲/۵ متر ایجاد شدند. به دلیل

نتایج و بحث

عملکرد گل خشک

اثر متقابل تراکم گیاهی و کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر عملکرد گل خشک معنی‌دار بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که با کاهش تراکم گیاهی، تأثیر کودهای آلی در افزایش عملکرد گل خشک تشدید شد، به‌این‌ترتیب که در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع، کودهای آلی اثر چندانی در افزایش عملکرد گل خشک نسبت به شاهد نداشتند، در حالی‌که در تراکم ۵ بوته در متر مربع کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی عملکرد گل خشک را به‌ترتیب ۷۱، ۳۱۰ و ۶۷ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند و در تراکم ۳ بوته در متر مربع نیز افزودن کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به خاک به‌ترتیب افزایش ۱۱۲، ۷۹ و ۲۲۳ درصدی عملکرد گل خشک را در مقایسه با شاهد به همراه داشت (جدول ۴).

به نظر می‌رسد که در تراکم‌های بالای گیاهی، عوامل محیطی و تابش خورشیدی به‌اندازه‌ی کافی در اختیار گیاه قرار نگرفته (۵۰) که این موضوع منجر به کاهش عملکرد گل خشک شد. اثر آرایش کاشت و تراکم بوته بر عملکرد گاو زبان ایرانی نشان داد که بیشترین میانگین عملکرد گل در واحد سطح در آرایش کاشت مربعی و تراکم ۶ بوته در متر مربع حاصل شد (۱۳). پس از بررسی عملکرد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گاو زبان اروپایی تحت‌تأثیر تراکم بوته (۶، ۱۰، ۱۴ و ۱۸ بوته در متر مربع) گزارش شد، بیشترین عملکرد دانه در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع بدست آمد (۲۹). تراکم ۴۰ بوته در متر مربع بابونه آلمانی، منجر به تولید بیشترین عملکرد گل خشک شد (۲۵). در یک پژوهش اثر تراکم‌های مختلف گیاهی (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ بوته در متر مربع) بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه آنیسون بررسی و گزارش شد که بیشترین عملکرد دانه در تراکم گیاهی ۲۵ بوته در متر مربع حاصل گردید (۴۸). در پژوهشی دیگر، پس از بررسی اثر فاصله ی بین (۶۰، ۷۰ و ۸۰ سانتی‌متر) و روی (۲۵، ۳۵ و ۴۵ سانتی‌متر) ردیف بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی مرزه (*Satureja khuzistanica*) گزارش شد که بیشترین عملکرد گل و قطر تاج‌پوشش در فاصله‌ی روی ردیف ۴۵ سانتی‌متر مشاهده شد و تراکم ۶/۶۷ بوته در متر مربع بیشترین عملکرد ماده‌ی خشک تولیدی را به خود اختصاص داد (۳۲). در یک پژوهش اثر سه تراکم ۲۰×۴۰، ۳۰×۴۰ و ۵۰×۳۰ سانتی‌متر بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی بادنجه‌یوه (*Melissa officinalis*) بررسی و گزارش شد که بیشترین مقدار عملکرد در تراکم ۲۰×۴۰ بدست آمد (۶۳). همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، اثر کودهای آلی مورد مطالعه در تراکم‌های گیاهی مختلف متفاوت بود، به طوری‌که در تراکم‌های ۱۰ و ۵ بوته در متر مربع کود ورمی کمپوست و در تراکم ۳ بوته در متر مربع کود گاوی عملکرد گل خشک بیشتری را نسبت به سایر تیمارها سبب شد.

دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و اواسط فرودین ماه ۱۳۹۱ در ردیف‌هایی به فاصله ۵۰ سانتی‌متر و بسته به تیمار مورد بررسی با فاصله‌ی روی ردیف ۲۰، ۴۰ و ۶۰ سانتی‌متر از یکدیگر کشت شدند. اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت و آبیاری‌های بعدی به فاصله هر ۷ روز یکبار تا آخر فصل رشد به روش نشتی انجام شد. برای رسیدن به تراکم مناسب، پس از رسیدن گیاه به مرحله‌ی ۴ برگ عملیات تنک انجام گرفت. به‌منظور کنترل علف‌های هرز، تنها سه نوبت وچین دستی در سال اول (به‌ترتیب ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از کاشت) و یک نوبت وچین دستی در سال دوم (۳۰ روز پس از رشد مجدد گیاه در سال دوم) انجام شد. برای آماده‌سازی زمین و در طول دوره‌ی رشد، هیچ‌گونه علف‌کش، آفت‌کش و قارچ‌کش شیمیایی استفاده نشد.

در سال زراعی دوم (۹۲-۱۳۹۱)، از ابتدا تا انتهای فصل گلدهی، گل‌های تمام سطح کرت‌های آزمایشی به‌صورت روزانه برداشت و وزن تر و خشک گل‌ها اندازه‌گیری شد. مجموع وزن خشک گل‌ها در طی دوره‌ی گلدهی به عنوان عملکرد گل در هر کرت در نظر گرفته شد. به‌منظور حفظ کمیت و کیفیت مواد مؤثره‌ی گیاه، نمونه‌های گل در سایه و در درجه حرارت محیط خشک شدند و سپس جهت تعیین ترکیبات ثانویه و مواد مؤثره‌ی گل‌ها، از هر یک از تیمارهای آزمایشی مقدار ۵۰ گرم گل خشک شده به آزمایشگاه منتقل و توسط دستگاه سوکسله عصاره‌گیری و در نهایت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، درصد فنول کل، درصد فلاونوئید کل و میزان آنتوسیانین کل آن تعیین شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش به دام‌اندازی رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) (Diphenyl Picrylhydrazyl) تعیین شد (۷۲). به‌منظور تعیین محتوای ترکیبات فنولی از روش فولین سیوکیو کالتیو (Folin-Ciocalteu) استفاده شد (۵۴). محتوای فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی تعیین گردید (۱۷). روش اختلاف pH (pH Different Method) برای تعیین میزان آنتوسیانین کل مورد استفاده قرار گرفت (۴۷). لازم به ذکر است ۳ بوته از هر کرت نیز به‌طور تصادفی انتخاب و در طول مرحله‌ی گلدهی تعداد گل‌های آنها شمارش شدند. در اواخر فصل رشد، با آغاز مرحله‌ی رسیدگی دانه‌ها و خشک شدن اندام هوایی گیاه، تعداد ۳ بوته از هر کرت به طور تصادفی انتخاب و صفاتی نظیر تعداد ساقه فرعی، طول ساقه فرعی، ارتفاع و قطر تاج‌پوشش آنها اندازه‌گیری شدند. جهت تعیین عملکرد دانه، بوته‌های تمام سطح کرت‌های آزمایشی برداشت و وزن دانه آنها تعیین گردید.

به‌منظور تجزیه واریانس (ANOVA) و تحلیل آماری داده‌های آزمایش و رسم نمودارها، از نرم‌افزارهای SAS Ver.9.1 و MS Excel Ver.11 استفاده شد. مقایسه‌ی کلیه‌ی میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گردید.

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و عملکرد گاو زبان ایرانی تحت تأثیر تراکم‌های مختلف و کاربرد کودهای آلی و شیمیایی (اوره)
Table 3- ANOVA (means of square) of some morphological characteristics and yield of *Echium amoenum* affected by different densities and application of organic and chemical (urea) fertilizers

منبع تغییرات Source of variations	ارتفاع بوته Plant height	طول ساقه فرعی Lateral branch lenght	تعداد ساقه فرعی در بوته Number of lateral branch per plant	وزن خشک گل در بوته Flower dry weight per plant	وزن تر گل در بوته Flower fresh weight per plant	تعداد گل در بوته Flower number per plant	عملکرد گل Flower yield
تراکم گیاهی Plant density	0.82ns	127.25*	196.46*	6251.45**	48149**	2810317**	18705961**
کود Fertilizer	540.38**	498.35**	831.02**	3143.43**	34964**	1722380**	9756188**
تراکم بوته×کود Plant density×Fertilizer	122.40ns	69.93*	518.18**	4348.00**	28566**	923445**	8632382**
خطای آزمایشی Error	74.91	40.99	45.82	616.57	1631.63	191739	345787
ضریب تغییرات Cv (%)	9.48	7.60	16.59	42.17	13.41	17.58	17.32

ns و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و عدم معنی‌دار. **، * و ns are significant at the 0.01 and 0.05 of probability level and non-significant, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل تراکم‌های مختلف و کاربرد کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و عملکرد گاو زبان ایرانی
Table 4- Mean comparison of interaction effects of different densities and application of organic and chemical (urea) fertilizers on some morphological characteristics and yield of *Echium amoenum*

تراکم Density (plant per m ²)	تیمار تغذیه‌ای Nutritional treatments	ارتفاع بوته Plant height (cm)	طول ساقه فرعی Lateral branch length (cm)	تعداد ساقه فرعی در بوته Number of lateral branch per plant	وزن تر گل در بوته Flower fresh weight per plant (g)	تعداد گل در بوته Flower number per plant	عملکرد گل Flower yield (kg.ha ⁻¹)
01	کمیپوست	99.00ab	92.55a	18.00g	267.53de	2268.1ed	3914.4bc
	ورمی کمیپوست	86.33a-c	76.41bc	46.33b-d	231.07ef	2594.9b-d	4340.7b
	گاو	90.00a-c	83.33ab	32.33ef	161.29f	3348.3b	2996.6cd
	شیمیایی	101.66a	83.77ab	36.00e-g	276.93de	2489.8cd	4392.1b
02	شاهد	78.00c	70.67c	50.66a-c	315.42cd	2528.9b-d	4219.3b
	کمیپوست	101.33a	95.68a	46.66b-d	467.86a	2178.3de	3654.0bc
	ورمی کمیپوست	96.00ab	91.00a	46.66b-d	384.43bc	2535.7b-d	8789.2a
	گاو	98.66ab	87.84ab	58.66ab	472.90a	4177.7a	3580.2bc
03	شیمیایی	82.33bc	84.84ab	22.00fg	158.10f	2576.3b-d	2142.7de
	شاهد	77.66c	76.49bc	37.66de	328.35cd	2650.4b-d	2142.7de
	کمیپوست	100.00a	92.31a	45.00cd	351.13c	1844.6de	2504.4d
	ورمی کمیپوست	90.00a-c	89.19a	60.00a	218.76ef	3123.7bc	2117.3de
04	گاو	98.66ab	93.30a	59.00ab	443.05ab	1871.6de	3818.6bc
	شیمیایی	86.00a-c	69.92c	27.00e-g	202.07ef	1640.9e	913.8f
	شاهد	82.66bc	76.14bc	26.00e-g	239.20e	1524.6e	1183.4ef

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column, means followed by the same letters are not significantly different ($p \leq 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

اروپایی شد (۷۱).

تعداد گل در بوته

در بررسی برهمکنش اثرات تراکم گیاهی و کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر تعداد گل در بوته مشاهده شد که اثر کودهای آلی مورد مطالعه در تراکم‌های مختلف گیاهی متفاوت بود، به‌طوری‌که کود گاوی در تراکم‌های ۱۰ و ۵ بوته در متر مربع و کود ورمی کمپوست در تراکم ۳ بوته در متر مربع از برتری قابل‌توجهی نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند، ضمن اینکه هر یک از کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی بهترین تأثیر خود را در افزایش تعداد گل در بوته به‌ترتیب در تراکم‌های ۱۰، ۳ و ۵ بوته در متر مربع نشان دادند (جدول ۴). همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، کود شیمیایی اوره در تراکم گیاهی ۵ بوته در متر مربع نقش مؤثرتری در افزایش تعداد گل در بوته ایفا کرد، به‌طوری‌که کاربرد آن در تراکم ۵ بوته در متر مربع به‌ترتیب منجر به افزایش ۳ و ۵۷ درصدی تعداد گل در بوته در مقایسه با کاربرد این کود در تراکم‌های ۱۰ و ۳ بوته در متر مربع شد. به‌نظر می‌رسد که کودهای آلی از طریق بهبود فعالیت‌های میکروبی خاک (۵۵)، افزایش ظرفیت نگهداری آب (۶۸) و فراهمی جذب بیشتر عناصر غذایی (۴۶)، سبب افزایش میزان فتوسنتز و مادهی خشک گیاهی شدند (۱۴) که این مسئله در نهایت به افزایش گلدهی گیاه انجامیده است. در یک پژوهش اثر کودهای آلی و بیولوژیک مختلف روی گیاه دارویی مرزه مورد مطالعه قرار گرفت و گزارش شد که ورمی کمپوست چه به تنهایی و چه در کاربرد همزمان با کودهای بیولوژیک نیتروکسین و نیتراژین منجر به بهبود خصوصیات کمی و کیفی گیاه شد (۶۱). در پژوهشی، اثر کودهای آلی و بیولوژیک مختلف بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) مورد مطالعه قرار گرفت و گزارش شد که کاربرد ۱۰ تن در هکتار ورمی کمپوست سبب افزایش تعداد گل شد (۱۸). به‌نظر می‌رسد در تراکم بالا (تراکم ۱۰ بوته در متر مربع)، احتمالاً رقابت درون‌گونه‌ای سبب شده گیاهان نتوانند استفاده مناسبی از امکانات محیطی و منابع تغذیه‌ای داشته باشند (۵۸) و در تراکم پایین (تراکم ۳ بوته در مترمربع) نیز احتمالاً میزان هدررفت منابع زیاد بوده (برخی از موارد عبارتند از طریق تبخیر از خاک، رقابت برون‌گونه‌ای، عدم قرارگیری منابع در محیط توسعه ریشه) (۱۶) و لذا در تراکم متوسط گیاهی استفاده مطلوب‌تری از منابع صورت گرفته است.

وزن تر گل در بوته

اثر متقابل تراکم گیاهی و کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر وزن

احتمالاً ورمی کمپوست به‌دلیل قدرت بالای ذخیره‌ی رطوبت نقش مهمی در فراهمی آب مورد نیاز گیاه ایفا کرده (۶۸) و از این طریق باعث تولید بیشتر عملکرد گل خشک شد. کود گاوی پوسیده در سطوح پایین تراکم گیاهی احتمالاً از طریق افزایش آزادسازی نیتروژن در خاک (۴۶)، عملکرد گل خشک را به میزان قابل‌توجهی افزایش داد. به نظر می‌رسد که کودهای آلی مورد مطالعه از طریق بهبود خصوصیات خاک و افزایش ظرفیت نگهداری آب (۴۶) منجر به بهبود عملکرد گیاه شدند، در حالی که کود شیمیایی اوره حاصلخیزی خاک را به همراه نداشت و نقش چندانی در فراهم کردن آب برای گیاه ایفا نکرد و در نتیجه عملکرد گل در این تیمار با کاهش مواجه شد. برخی مطالعات نشان داده است که مصرف کودهای آلی باعث کاهش اثرات شوری و افزایش جذب فسفر و نیتروژن شده و در نتیجه بهبود خصوصیات کمی و کیفی گیاهان را به همراه دارد (۶۲). استفاده از ورمی کمپوست ۳۰ درصد، منجر به تولید بیشترین میزان آنتوسیانین در گاو زبان ایرانی شد (۲۴). در یک پژوهش گزارش شد عملکرد گل خشک در گاو زبان ایرانی تحت‌تأثیر کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و کود گاوی به‌ترتیب ۲۵، ۲۸ و ۲۷ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت، ضمن اینکه مشخص شد متغیرهای ارتفاع بوته، عملکرد اندام هوایی و تعداد گل در بوته، اصلی‌ترین عوامل مؤثر بر عملکرد گل بودند (۸). کاربرد کمپوست و ورمی کمپوست ضمن کمک به گاو زبان اروپایی در شرایط تنش خشکی، میزان عملکرد گل خشک را در مقایسه با شاهد افزایش داد. در یک پژوهش پس از بررسی اثر کودهای آلی مختلف بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی اسفرزه گزارش شد که کاربرد ۶ تن در هکتار ورمی کمپوست منجر به تولید بیشترین عملکرد شد (۱۲). بیشترین وزن خشک بوته و عملکرد اسانس گیاه دارویی بادرشی در شرایط کاربرد ۲۰ تن کود دامی بدست آمد (۴۴). در پژوهشی دیگر، بیشترین ارتفاع بوته (۶۲/۸۳ سانتی‌متر) و عملکرد زیست‌توده (۹۲۸۱/۷۱ کیلوگرم در هکتار) گیاه دارویی گشنیز در تیمار کاربرد ۹ تن در هکتار کود دامی مشاهده شد، ولی بیشترین شاخص سطح برگ (۱/۴۲)، عملکرد دانه (۱۳۹۹/۸۴ کیلوگرم در هکتار) و درصد اسانس (۰/۵۶ درصد) در تیمار ۱۲ تن کود دامی در هکتار حاصل شد (۶۰). کاربرد میزان ۶۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیشترین تولید بذر در بوته گاو زبان ایرانی را سبب شد (۴۹). بیشترین تعداد ساقه فرعی، ارتفاع، عملکرد سرشاخه‌گذار و عملکرد موسیلاژ و اسانس در گاو زبان اروپایی با مصرف ۵۰ درصد کود شیمیایی (اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم) به‌علاوه کود زیستی (نیتروکسین حاوی ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم) حاصل شد (۳۵). مصرف ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی نیتروژن در شرایط تلقیح بذر با نیتروکسین منجر به تولید بیشترین ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، عملکرد خشک سرشاخه‌گذار و عملکرد خشک بوته گاو زبان

تر گل در بوته معنی دار بود (جدول ۳)، به طوری که بیشترین و کمترین وزن تر گل در بوته به ترتیب در تیمارهای تراکم ۵ بوته در متر مربع و کود گاوی (۴۷۲/۹۰ گرم) و تراکم ۵ بوته در متر مربع و کود شیمیایی اوره (۱۵۸/۱۰ گرم) مشاهده شد (جدول ۴). با توجه به ضرایب همبستگی محاسبه شده بین صفات مختلف (جدول ۵)، بین وزن تر گل در بوته و تعداد ساقه فرعی در بوته همبستگی مثبت و معنی دار ($r=0.54^{***}$) در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت، لذا با توجه به اینکه استفاده از کودهای آلی باعث افزایش تعداد ساقه فرعی در بوته شد (جدول ۴)، بهبود وزن تر گل در بوته در شرایط استفاده از این کودها منطقی به نظر می‌رسد.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در گاو زبان ایرانی تحت تأثیر تراکم‌های مختلف و کاربرد کودهای آلی و شیمیایی (اوره)
Table 5- Correlation coefficients between studied characteristics in *Echium amoenum* affected by different densities and application of organic and chemical (urea) fertilizers

کد	صفت	1	2	3	4	5	6
1	عملکرد گل Flower yield	1					
2	تعداد گل در بوته Flower number per plant	0.21ns	1				
3	وزن تر گل در بوته Flower fresh weight per plant	0.38**	0.10ns	1			
4	تعداد ساقه فرعی در بوته Number of lateral branch per plant	0.27ns	0.30*	0.54**	1		
5	طول ساقه فرعی Lateral branch length	0.30*	0.09ns	0.41**	0.22ns	1	
6	ارتفاع بوته Plant height	0.29*	0.03ns	0.41**	0.22ns	0.53**	1

***، ** و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و عدم تفاوت معنی دار.

*** and * are significant at the 0.01 and 0.05 of probability level, respectively and ns is non significant.

تراکم‌های متوسط گیاهی (۵ بوته در متر مربع) بود. به نظر می‌رسد که کودهای آلی با توجه به دارا بودن مقادیر مناسب نیتروژن، فسفر و پتاسیم و فرم گوگرد قابل استفاده در طول دوره رشد (۶۹) باعث بهبود رشد اندام‌های رویشی و زایشی گیاه شدند و در نتیجه وزن خشک گل در بوته افزایش یافت. نتایج برخی محققین (۷۳) بیانگر اثر مثبت کودهای دامی بر مقدار ماده‌ی خشک گیاه دارویی اسفرزه بود. در آزمایشی دو ساله اثر فواصل کاشت (۱۵، ۳۰ و ۳۵ سانتی‌متر روی ردیف) بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی آویشن (*Thymus vulgaris* L.) بررسی و گزارش شد که در هر دو سال مورد مطالعه بیشترین وزن تر و خشک اندام اقتصادی در شرایطی بدست آمد که فواصل کاشت روی ردیف ۱۵ سانتی‌متر بود (۷). در پژوهشی، اثر تراکم‌های مختلف (۱۲/۵، ۱۶/۶ و ۲۵ بوته در متر مربع) بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی گشنیز بررسی و گزارش شد که با افزایش تراکم، تعداد چتر در بوته، وزن هزار دانه و وزن خشک بوته با کاهش مواجه شد (۶). در آزمایشی دیگر، پس از بررسی اثر تراکم‌های مختلف گیاهی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) گزارش شد که با افزایش فاصله‌ی بین ردیف‌های کاشت از ۵۰ به ۱۰۰ سانتی‌متر، وزن تر و خشک گل در بوته افزایش یافت (۴۳).

در یک پژوهش، در کشت ارگانیک ریحان مصرف کمپوست خصوصیات کمی و کیفی گیاه را بهبود بخشید (۲۲). در پژوهشی دیگر، اثر کودهای آلی مختلف بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis*) بررسی و گزارش شد که بیشترین وزن خشک گل در تیمار ورمی کمپوست به همراه تلقیح با کود فسفاته بارور بدست آمد (۵۹). در یک پژوهش، پس از بررسی اثر کودهای آلی و شیمیایی مختلف روی گیاه دارویی اسفرزه مشاهده شد که کاربرد کمپوست در اکثر صفات مورد مطالعه نسبت به کود شیمیایی دارای برتری بود، به طوری که بیشترین عملکرد گیاه در تیمار ۸ تن در هکتار کمپوست بدست آمد (۳۷). همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، اثر تمامی کودهای آلی مورد مطالعه در تراکم ۵ بوته در متر مربع تشدید شد، به طوری که در این تراکم گیاهی وزن تر گل در بوته در نتیجه‌ی کاربرد کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به ترتیب ۷۵، ۶۶ و ۱۹۳ درصد نسبت به کودهای مشابه در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع و به ترتیب ۳۳، ۷۶ و ۷ درصد نسبت به کودهای مشابه در تراکم ۳ بوته در متر مربع افزایش یافت. به نظر می‌رسد که در تراکم‌های گیاهی بیش از حد مطلوب، عوامل محیطی و تابش خورشیدی به اندازه‌ی کافی در اختیار گیاه قرار نگرفتند و در تراکم‌های کمتر از حد مطلوب از امکانات محیطی موجود به نحو کارآمد استفاده نشد (۱۶)، در نتیجه در هر دو حالت وزن تر گل در بوته کمتر از

تعداد ساقه فرعی در بوته

در بررسی اثر متقابل تراکم گیاهی و کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر تعداد ساقه فرعی در بوته مشاهده شد که تمامی کودهای آلی مورد مطالعه در تراکم‌های ۵ و ۳ بوته در متر مربع تعداد ساقه فرعی در بوته را نسبت به شاهد افزایش دادند، به‌طوری که تعداد ساقه فرعی در بوته در کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به ترتیب ۱۹، ۱۹ و ۵۶ درصد در تراکم ۵ بوته در متر مربع و به ترتیب ۷۳، ۱۳۱ و ۱۲۷ درصد در تراکم ۳ بوته در متر مربع در مقایسه با شاهد افزایش یافت (جدول ۴). با توجه به وجود عناصر غذایی در کودهای آلی و تأثیری که این کودها در فراهمی و جذب مواد غذایی و رطوبت دارند (۷۴)، افزایش تعداد ساقه‌های فرعی در شرایط استفاده از این کودها منطقی به نظر می‌رسد. به نظر می‌رسد که در بوته‌های با تعداد ساقه فرعی بیشتر، گیاه احتمالاً بیشتر ذخایر غذایی خود را صرف رشد رویشی کرد، لذا رشد زایشی دچار نقصان شد، به‌طوری که تعداد چرخه‌های گل بارور در این بوته‌ها با کاهش مواجه شد و عملکرد گل با افزایش تعداد ساقه فرعی در بوته کاهش یافت. انجام پژوهشی بر روی ریحان نشان داد که کاربرد سطوح مختلف ورمی کمپوست منجر به افزایش عملکرد زیستی گیاه نسبت به شاهد شد (۹). بر اساس نتایج پژوهشی در گیاه دارویی همیشه بهار، مصرف کودهای آلی به ویژه ورمی کمپوست، افزایش معنی‌دار تعداد ساقه فرعی در بوته و تعداد گل در بوته را به همراه داشت (۵۹). همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، کود شیمیایی اوره در هیچ‌یک از تراکم‌های گیاهی مورد مطالعه نتوانست نقش مؤثری در افزایش تعداد ساقه فرعی در بوته ایفا کند و به‌ویژه در تراکم‌های ۵ و ۳ بوته در متر مربع، اثر کمتری نسبت به کودهای آلی داشت.

طول ساقه فرعی

اثر متقابل تراکم و کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر طول ساقه فرعی معنی‌دار بود (جدول ۳)، به‌طوری که در تمامی تراکم‌های مورد مطالعه، طول ساقه فرعی در شرایط استفاده از کودهای آلی نسبت به شاهد بیشتر بود، البته لازم به ذکر است که کودهای کمپوست و ورمی کمپوست در تراکم ۵ بوته در متر مربع و کود گاوی در تراکم ۳ بوته در متر مربع، اثر بیشتری در افزایش طول ساقه فرعی داشتند (جدول ۴). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که کاربرد کودهای آلی بر رشد گیاه و خصوصیات خاک اثر مثبت داشته و مقدار مواد غذایی در دسترس گیاه را افزایش می‌دهد (۳۹ و ۷۴). در یک پژوهش، پس از بررسی اثر کودهای آلی مختلف بر خصوصیات کمی و کیفی چندین گیاه دارویی گزارش شد که ورمی کمپوست باعث افزایش ارتفاع بوته ی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) و افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی گیاه بادرنجبویه شد (۱۹). با کاهش تراکم گیاهی نقش کودهای آلی در افزایش طول ساقه فرعی نسبت به کودهای

شیمیایی اوره بیشتر نمایان شد، به‌طوری که در تراکم‌های ۱۰ و ۵ بوته در متر مربع، بین کودهای آلی و شیمیایی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳)، ولی در تراکم ۳ بوته در متر مربع، طول ساقه فرعی در تمامی کودهای آلی مورد مطالعه نسبت به کود شیمیایی افزایش یافت و در این تراکم گیاهی کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به ترتیب منجر به افزایش ۳۲، ۲۸ و ۳۳ درصدی طول ساقه فرعی در مقایسه با کود شیمیایی اوره شدند (جدول ۴). در یک پژوهش اثر محلول‌پاشی با غلظت‌های مختلف عصاره ی ورمی کمپوست (صفر، ۳۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ پی‌پی‌ام) بر صفات مورفولوژیک گیاه دارویی بادرنجبویه بررسی و گزارش شد که بیشترین طول ساقه، تعداد گره، سطح برگ و وزن خشک بوته مربوط به تیمار ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام ورمی کمپوست بود (۵۱).

ارتفاع بوته

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، در تمامی تراکم‌های گیاهی مورد مطالعه، کودهای آلی منجر به افزایش ارتفاع بوته در مقایسه با شاهد شدند، به‌طوری که ارتفاع بوته در کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به ترتیب ۲۷، ۱۱ و ۱۵ درصد در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع، به ترتیب ۳۰، ۲۴ و ۲۷ درصد در تراکم ۵ بوته در متر مربع و به ترتیب ۲۱، ۹ و ۱۹ درصد در تراکم ۳ بوته در متر مربع نسبت به شاهد افزایش یافت، ضمن اینکه کود شیمیایی اوره نیز در تراکم‌های ۱۰، ۵ و ۳ بوته در متر مربع عملکرد دانه را به ترتیب از افزایش ۳۰، ۶ و ۴ درصدی بهره‌مند ساخت. اثرات مثبت کودهای آلی بر خصوصیات کمی و کیفی گیاهان مختلف در آزمایشات متعددی (۲۰ و ۳۹) مورد تأکید قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که کودهای آلی احتمالاً از طریق بهبود خواص شیمیایی و فیزیکی خاک و افزایش ظرفیت نگهداری عناصر غذایی (۱۰) باعث بهبود خصوصیات رشدی گیاه و از جمله ارتفاع آن شدند. در یک پژوهش، اثر کودهای آلی بر خصوصیات کمی و کیفی گیاهان دارویی اسفرزه، قدومه شیرازی (*Alyssum homolocarpum* L.)، قدومه شهری (*Lepidium perfoliatum* L.) و تخم‌شربتی (*Lalementia iberica* L.) مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که تیمار کود گاوی منجر به تولید بیشترین ارتفاع گیاهان در مقایسه با سایر تیمارها شد، ضمن اینکه ارتفاع تمامی گیاهان مورد مطالعه در کودهای ورمی کمپوست، کمپوست قهوه و کمپوست قارچ نیز نسبت به شاهد بیشتر بود (۳۸).

میزان فعالیت آنزیم اکسیدانی و فنول کل

در بررسی اثرات متقابل تراکم گیاهی و کودهای آلی مختلف و کود شیمیایی (اوره) مشاهده شد که اثر کودهای آلی بر فعالیت آنزیم اکسیدانی در تراکم‌های گیاهی مختلف متفاوت بود (جدول ۶)، به

ورمی کمپوست سایر کودها دارای اثر منفی بر فعالیت آنتی اکسیدانی بودند (جدول ۷). کودهای کمپوست، ورمی کمپوست، گاوی و شیمیایی (اوره) در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع میزان فنول کل را به ترتیب ۱۰۶، ۵۴، ۶۶ و ۱۷۳ درصد در مقایسه با شاهد افزایش دادند، ضمن این که کود شیمیایی در تراکم ۵ بوته در متر مربع نیز میزان فنول کل را از افزایشی ۳۵ درصدی نسبت به شاهد برخوردار کرد (جدول ۷).

این ترتیب که هر یک از کودهای کمپوست، ورمی کمپوست و گاوی به ترتیب در تراکم های ۱۰، ۵ و ۳ بوته در متر مربع بیشترین تأثیرگذاری خود را در بهبود میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نمایان کردند (جدول ۷). تمامی کودهای آلی مورد بررسی در تراکم های ۳ و ۵ بوته در متر مربع منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به شاهد شدند، ولی با افزایش تراکم گیاهی از ۵ به ۱۰ بوته در متر مربع به جز

جدول ۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برخی ویژگی های کیفی گاو زبان ایرانی تحت تأثیر تراکم های مختلف و کاربرد کودهای آلی و شیمیایی (اوره)

Table 6- Analysis of variance (means of square) of some qualitative characteristics of *Echium amoenum* affected by different densities and application of organic and chemical (urea) fertilizers

منبع تغییرات Source of variations	میزان فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	میزان فنول کل Total phenol	میزان فلاونوئید کل Total flavonoid	میزان آنتوسیانین کل Total anthocyanin
تراکم گیاهی Plant density	624.22**	389.17**	47868**	4.30**
کود Fertilizer	156.70**	272.56**	12353**	8.82**
تراکم بوته × کود Plant density × Fertilizer	1095.17**	629.43**	21834**	6.76**
خطای آزمایشی Experimental error	12.22	32.43	1380	0.0000001
درصد ضریب تغییرات Cv (%)	14.79	12.61	19.48	11.41

***، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و عدم معنی دار.

***, * and ns are significant at the 0.01 and 0.05 of probability level and non-significant, respectively.

جدول ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل تراکم های مختلف و کاربرد کودهای آلی و شیمیایی (اوره) بر برخی ویژگی های کیفی گاو زبان ایرانی

Table 7- Mean comparison of interaction effects of different densities and application of organic and chemical (urea) fertilizers on some qualitative characteristics of *Echium amoenum*

تراکم Density (plant per row)		میزان فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity (mg.ml ⁻¹)	میزان فنول کل Total phenol (mg GAE.g ⁻¹ flower DW)	میزان فلاونوئید کل Total flavonoid (mg QE.100g ⁻¹ flower DW)	میزان آنتوسیانین کل Total anthocyanin (mg.g ⁻¹ flower DW)
10	کمپوست Compost	97.55a	47.50bc	366.60bc	0.0026bc
	ورمی کمپوست Vermicompost	58.93g	35.66de	318.54c	0.0029b
	گاوی Cow manure	41.27i	38.39cd	491.29a	0.0028bc
	شیمیایی Chemical fertilizer	57.99g	63.05a	419.29b	0.0023bc
	شاهد Control	75.98c-e	23.11f	427.16b	0.0023bc
5	کمپوست Compost	67.49f	52.51b	348.30c	0.0042a
	ورمی کمپوست Vermicompost	82.20c	43.27b-d	360.60bc	0.0040a
	گاوی Cow manure	88.13b	34.95de	301.96c	0.0036a
	شیمیایی Chemical fertilizer	76.96cd	71.36a	330.73c	0.0036a
	شاهد Control	50.24h	52.76b	306.76c	0.0023bc
3	کمپوست Compost	70.61ef	42.03b-d	539.93a	0.0026bc
	ورمی کمپوست Vermicompost	72.27d-f	49.91b	539.65a	0.0028bc
	گاوی Cow manure	96.64a	44.44b-d	494.45a	0.0026bc
	شیمیایی Chemical fertilizer	79.78c	26.20ef	300.99c	0.0021c
	شاهد Control	76.92cd	52.00b	326.85c	0.0030b

در هر ستون، میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن تفاوت معنی داری ندارند.

In each column, means followed by the same letters are not significantly different ($p \leq 0.05$) based on Duncan's multiple range test.

کمپوست بر گیاه توت‌فرنگی (*Vesca fragaria*)، گزارش شد که کاربرد کمپوست، باعث افزایش ارتفاع، عملکرد کل، درصد مواد جامد محلول و آنتوسیانین میوه شد (۷۰). کاربرد همزمان ۱۲ تن در هکتار کود گاوی، ۷/۵ تن در هکتار ورمی‌کمپوست و ۷۵ کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی (فسفات آمونیوم) منجر به تولید بیشترین عملکرد اسانس و بیشترین میزان کامازولن در گیاه دارویی بابونه آلمانی شد (۵۲). نتایج پژوهش‌های متعدد روی گیاهان دارویی از جمله بابونه رومی (*Chamaemelum nobile*) (۴۰)، بابونه آلمانی (۶۴)، بادرنشینی (۴۱)، ریحان (۹) و رازیانه (۱۸) نشان داد که کاربرد ورمی‌کمپوست سبب افزایش کمی و کیفیت ماده‌ی مؤثره گردید.

قابلیت دسترسی عناصر غذایی مختلف در خاک تحت‌تأثیر تنش‌های محیطی (نظیر تنش‌های ناشی از عدم رعایت تراکم مطلوب گیاهی و تنش‌های تغذیه‌ای) تغییرات قابل ملاحظه‌ای می‌یابد، بنابراین مدیریت تغذیه گیاه نقش اساسی در تولید محصولات گیاهی داشته و گیاهی که خوب تغذیه شده و به مقدار کافی عناصر غذایی را دریافت کرده باشد، مقاومت بهتری به تنش‌ها خواهد داشت (۱۶). واکنش گیاه دارویی مرزه سهندی (*Satureja sahandica* Bormn.) به تراکم‌های مختلف کاشت (۸، ۱۰ و ۱۲ بوته در متر مربع) بررسی و گزارش شد که با افزایش تراکم کاشت تا سطح ۱۰ بوته در متر مربع عملکرد اسانس افزایش یافت، در حالی که افزایش بیشتر تراکم گیاهی عملکرد اسانس را با روندی کاهشی مواجه کرد (۴).

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان داد که تراکم گیاهی به‌طور معنی‌داری بر تمامی صفات مورد مطالعه تأثیر داشت، به‌طوری‌که بیشترین عملکرد گل، وزن تر و خشک گل در بوته، طول ساقه فرعی و قطر تاج‌پوشش در تراکم ۵ بوته در متر مربع و بیشترین تعداد ساقه فرعی در بوته در تراکم ۳ بوته در متر مربع مشاهده شد، البته از آنجایی‌که در گاو زبان ایرانی عملکرد گل مهمترین فاکتور کمی محسوب می‌شود، لذا با توجه به نتایج این پژوهش برای کاشت این گیاه تراکم گیاهی ۵ بوته در متر مربع توصیه می‌شود. تمامی کودهای آلی مورد مطالعه اکثر صفات مورد بررسی را در مقایسه با شاهد بهبود بخشیدند، به‌طوری‌که کود کمپوست منجر به تولید بیشترین وزن تر گل در بوته و طول ساقه فرعی شد، کود ورمی‌کمپوست بیشترین تأثیر را در افزایش عملکرد گل، وزن خشک گل در بوته، تعداد ساقه فرعی در بوته و قطر تاج‌پوشش ایفا کرد. با مقایسه‌ی کودهای آلی و شیمیایی مشاهده شد که اثر کودهای آلی در بهبود اکثر صفات مورد بررسی، بیشتر از کود شیمیایی اوره بود (جدول ۴). نتایج اثر متقابل تراکم و کودهای آلی و شیمیایی (اوره) نشان داد که کودهای آلی در کشت‌های متراکم

به‌نظر می‌رسد که کاربرد کودهای آلی در خاک ضمن تأمین مقادیری از عناصر غذایی، باعث بهبود ساختمان خاک، افزایش ظرفیت نگهداری رطوبت، امکان آماده‌سازی بستر مناسب‌تر برای رشد ریشه و افزایش سبزیگی گیاه شده و از این طریق بهبود خصوصیات کیفی گیاه را در پی داشته است (۵۶). برخی محققین افزایش عملکرد کیفی گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) را در نتیجه‌ی کاربرد کودهای آلی گزارش کردند (۶۷). تأثیر نهاده‌های زیستی و آلی را بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی انیسون بررسی و گزارش شد که با افزایش مقدار مصرفی ورمی‌کمپوست از صفر به ۵ و از ۵ به ۱۰ تن در هکتار درصد اسانس، عملکرد اسانس، درصد آنتول و درصد متیل کایوکول در مقایسه با شاهد افزایش یافت (۳۶). در پژوهش دیگری، بیشترین عملکرد اسانس و میزان آنتول اسانس گیاه دارویی رازیانه در تیمار مخلوط کمپوست و ورمی‌کمپوست بدست آمد (۴۵).

جهت استفاده مطلوب از عوامل محیطی نظیر نور، آب، مواد غذایی و نیز جلوگیری از بروز رقابت شدید، تعداد بوته در واحد سطح باید در حد بهینه باشد. تراکم بوته مطلوب تراکمی است که در نتیجه‌ی آن کلیه‌ی عوامل محیطی به‌طور مؤثر مورد استفاده گیاه قرار گرفته و در عین حال رقابت‌های درون‌بوته‌ای و بین‌بوته‌ای در حداقل باشند تا حداکثر عملکرد ممکن با کیفیت مطلوب بدست آید (۱۶). افزایش تراکم گیاهی منجر به افزایش مقدار و درصد اسید رزمارینیک گیاه دارویی مریم‌گلی شد (۲). افزایش تراکم به دلیل کاهش نفوذ نور به پوشش گیاهی، کاهش عملکرد اسانس مرزه (۳۲) را در پی داشت، در حالی که عملکرد اسانس نعنای فلفلی با افزایش تراکم از ۸ به ۲۰ بوته در متر مربع افزایش یافت (۳۱).

میزان فلاونوئید کل و آنتوسیانین کل

نتایج اثرات متقابل تراکم گیاهی و کودهای آلی مختلف و شیمیایی (اوره) نشان داد که کود گاوی در تراکم‌های ۳ و ۱۰ بوته در متر مربع در بهبود میزان فلاونوئید کل مؤثر واقع شد (جدول ۶)، به طوری‌که فلاونوئید کل را در هر یک از تراکم‌های ۳ و ۱۰ بوته در متر مربع به ترتیب ۵۱ و ۱۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داد (جدول ۷). کاربرد کودهای کمپوست و ورمی‌کمپوست نیز در تراکم ۳ بوته در متر مربع منجر به افزایش ۶۵ درصدی میزان فلاونوئید کل نسبت به شاهد شد (جدول ۷). افزایش و یا کاهش بیش از حد تراکم گیاهی (در تراکم‌های ۳ و ۱۰ بوته در متر مربع) از نظر میزان آنتوسیانین کل دارای اثر منفی بر اثرات کودهای آلی بود، ولی در تراکم متوسط گیاهی (۵ بوته در متر مربع) استفاده از کودهای کمپوست، ورمی‌کمپوست و گاوی میزان آنتوسیانین کل را به ترتیب ۸۳، ۷۴ و ۵۷ درصد در مقایسه با شاهد افزایش داد (جدول ۷). با بررسی اثر

گاوزبان ایرانی نتوانستند قابلیت‌های خود را در بهبود خصوصیات کمی گیاه نمایان سازند، به‌طوری‌که این کودها در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع حتی بعضاً دارای اثر منفی بر برخی نظیر وزن تر گل در بوته، تعداد ساقه فرعی در بوته، طول ساقه فرعی و ارتفاع بوته بودند، در حالی‌که با افزایش فواصل کاشت روی ردیف، اثر کودهای آلی در بهبود اکثر صفات مورد بررسی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به نظر می‌رسد که با کاهش تراکم گیاهی، احتمالاً رقابت درون‌گونه‌ای بر سر منابع غذایی کاهش یافته و بوته‌های گاوزبان به‌طور مؤثرتری از عناصر غذایی کودهای آلی بهره بردند. نتایج آزمایش حاکی از آن بود که در سطوح مختلف تراکم گیاهی، کودهای آلی متفاوت دارای بیشترین تأثیر در بهبود خصوصیات کمی گیاه بودند، به‌عنوان مثال در ارتباط با عملکرد گل، کود ورمی‌کمپوست در تراکم‌های ۱۰ و ۵ بوته در متر مربع و کود گاوی در تراکم ۳ بوته در متر مربع نسبت به سایر

کودهای آلی دارای برتری بودند. نتایج صفات کیفی حاکی از آن بود که کود گاوی در تراکم‌های ۳ و ۵ بوته در متر مربع و کود کمپوست در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع بیشترین تأثیر را در افزایش میزان فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی ایفا کرد. تمامی کودهای آلی و شیمیایی (اوره) مورد مطالعه در تراکم ۱۰ بوته در متر مربع منجر به افزایش میزان فنول کل شدند و کود گاوی بیشترین میزان فلاونوئید کل را در تراکم‌های ۳ و ۱۰ بوته در متر مربع سبب شد و میزان آنتوسیانین کل در تراکم ۵ بوته در متر مربع تحت تأثیر کودهای آلی و شیمیایی (اوره) افزایش یافت. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از کودهای آلی در تراکم‌های مطلوب گیاهی می‌تواند ضمن بهبود خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی گاوزبان ایرانی، اثرات مخرب ناشی از مصرف کودهای شیمیایی را کاهش داده و سلامت محصول و پایداری تولید را در درازمدت تضمین کند.

منابع

- 1- Ahmadabadi Z., Ghajar Sepanlou M., and Bahmanyar M.A. 2012. Effect of vermicompost application on amount of micro elements in soil and the content in the medicinal plant of *Borago officinalis*. Iranian Journal of Crops Improvement, 13: 1-12. (In Persian with English abstract)
- 2- Abu-Darwish M., Al-Ramamneh E.A.D., Salamon I., Abu-Dieyeh Z., Al-Nawaiseh M., and Albdour T. 2013. Determination of essential oil bioactive components and rosmarinic acid of *Salvia officinalis* cultivated under different intra-row spacing. Notulae Scientia Biologicae 5: 198-203.
- 3- Ahmadian A., Ghanbari A., and Galavi M. 2006. Effect of animal manure on quantitative and qualitative yield and chemical composition of essential oil in cumin (*Cuminum cyminum*). Iranian Journal of Field Crops Research 4: 1-10. (In Persian with English abstract)
- 4- Akbarinia A., Ghalavand A., Sefidkan F., Tahmasebi Z., Sharifi A., and Rezaee M. 2002. Evaluation of Copticum yield and oil in organic, conventional and integrated farming systems. 7th agronomy and plant breeding of Iran, Seed and Plant Research Institute, Karaj. (In Persian with English abstract)
- 5- Akbar Nejad F., Astaraee A., Fotovat A., and Nassiri Mahallati M. 2010. Effect of municipal solid waste compost and sewage sludge on yield and yield component of *Nigella sativa* L. Iranian Journal of Field Crops Research 8: 767-771. (In Persian with English abstract)
- 6- Akhani A., Darzi M.T., and Haj Seyed Hadi M.R. 2012. Effects of biofertilizer and plant density on yield components and seed yield of coriander (*Coriandrum sativum*). International Journal of Agriculture and Crop Sciences 4: 1205-1211.
- 7- Al-Dein E., and Al-Ramamneh M. 2009. Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. in response to population density. Industrial Crops and Products 30: 389-394.
- 8- Amiri M.B., Rezvani Moghaddam P., and Jahan M. 2016. Study the morphological characteristics affecting yield of *Echium amoenum* under different organic and chemical fertilizer and plant densities. Iranian Journal of Horticultural Science 47: 55-69. (In Persian with English abstract)
- 9- Anwar M., Patra D.D., Chand S., Alpesh K., Naqvi A., and Khanuja S.P.S. 2005. Effect of organic manures and inorganic fertilizer on growth, herb and oil yield, nutrient accumulation and oil quality of French basil. Communication in Soil Science and Plant Analysis 36: 1737-1746.
- 10- Arancon N.Q., Edwards C.A., Bierman P., Welch C., and Metzger J.D. 2004. Influence of vermicompost on field strawberries. Bioresource Technology 93: 145-153.
- 11- Arancon N.Q., Galvis P.A., and Edwards A. 2005. Suppression of insect pest populations and damage to plants by vermicomposts. Bioresource Technology 96: 1137-1142.
- 12- Asadi Gh.A., Momen A., Noruzade Nameghi M., and Khoramdel S. 2014. Effect of different levels of organic and chemical fertilizers on yield and nitrogen efficiency of *Plantago ovate* Forsk. Iranian Journal of Agroecology 5: 373-382. (In Persian with English abstract)
- 13- Ashouri D., Nourhosieni Niaki S.A., Safarzadeh Vishkaei M.N., Aminpanah H., and Sharifi P. 2013. Effect of planting pattern and plant density on yield of *Echium amoenum* L. harvested in three years. Journal of Crop Production Research 261-276. (In Persian with English abstract)
- 14- Atiyeh R.M., Lee S.S., Edwards C.A., Arancon N.Q., and Metzger J. 2002. The influence of humic acid derived

- from earthworm-processed organic waste on plant growth. *Bioresource Technology* 84: 7-14.
- 15- Azizi M., Razavi M., Hasanazadeh Khayyat M.H., Lakzian A., and Neamati H. 2009. Effect of various levels of vermicompost and irrigation on morphologic characteristic of *Matricaria recutita* Var. Goral. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 24: 82-93. (In Persian with English abstract)
- 16- Caliskan M.E., Kusman N., and Caliskan S. 2009. Effects of plant density on the yield and yield components of true potato seed (TPS) hybrids in early and main crop potato production systems. *Field Crops Research* 114: 223-232.
- 17- Chang Y.L. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal Agricultural Food Chemistry* 50: 3713-3717.
- 18- Darzi M.T., Ghalavand A., Rejali F., and Sefidkon F. 2006. Effects of biofertilizers application on yield and yield components in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 22: 278-292. (In Persian with English abstract)
- 19- Delate K. 2000. *Heenah mahyah student from herb trail*. Leopold center for sustainable agriculture. Annual Reports, Iowa State University. Ames, IA.
- 20- D'Hose T., Cougnon M., De Vlieghe A., Vandecasteele B., Viaene N., Cornelis W., Van Bockstaele E., and Reheul D. 2014. The positive relationship between soil quality and crop production: A case study on the effect of farm compost application. *Applied Soil Ecology* 75: 189-198.
- 21- Doan T.T., Ngo P.T., Rumpel C., Nguyen B.V., and Jouquet P. 2013. Interactions between compost, vermicompost and earthworms influence plant growth and yield: A one-year greenhouse experiment. *Scientia Horticulturae* 160: 148-154.
- 22- Elgendy S.A., Hosni A.M., Omer E.A., and Reham M.S. 2001. Variation in herbage yield, essential oil yield and oil composition on sweet basil (*Ocimum basilicum*) grown organically in newly reclaimed and in Egypt. *Arab Universities Journal of Agricultural Science* 9: 915-933.
- 23- Fallahi J., Koocheki A., and Rezvani Moghaddam P. 2008. Investigating the effects of organic fertilizers on quantity index and the amount of essential oil and chamazulene in chamomile (*Matricaria recutita*). *Iranian Journal of Water, Soil and Plant in Agriculture* 8: 157-168. (In Persian with English abstract)
- 24- Faraji M., and Poursakhi K. 2018. Effects of biological and organic fertilizers on morphological and phytochemical characteristics of Iranian borage (*Echium amoenum* Fisch. & C.A.Mey.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 34: 50-61. (In Persian with English abstract)
- 25- Farhang Meher S., Akbari Sh., and Rezvan Beidokhti Sh. 2014. Effect of planting date and plant density on flower yield and some morphological characteristics of *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Plant Ecophysiology* 6: 79-87. (In Persian with English abstract)
- 26- Ghilavizadeh A., Darzi M.T., Haj Seyed Hadi M.R., and Rejali F. 2012. Influence of plant growth promoter bacteria and plant density on yield components and seed yield of ajowan (*Carum copticum*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4: 1255-1260.
- 27- Gutierrez F.A., Santiago J., Molina J.A.M., Nafate C.C., Abud M., Llaven M.A.O., Rincon R., and Dendooven L. 2007. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Bioresource Technology* 98: 2781-2786.
- 28- Haj Seyyed Hadi M.R., Darzi M.T., Riazhi Gh.H. and Ghandarhari Z. 2013. Evaluation of effect of vermicompost and aminoacids on yield and yield components of *Matricaria chemmommilla*. *Iranian Journal of Plant and Ecosystem* 33: 67-80. (In Persian with English abstract)
- 29- Hasanvand H., Siadat S.A., Bakhshandeh A.M., Moradi Telavat M.R., and Poshtdar A. 2018. Evaluation of yield and some physiological characteristics of borage (*Borago officinalis* L.) under plant density and sowig dates in Ahwaz region. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 34: 1-16. (In Persian with English abstract)
- 30- Heidari M.R., Azad E.M., and Mehrabani M. 2006. Evaluation of the analgesic effect of Echium amoenum Fisch & C.A. Mey. Extract in mice: Possible mechanism involved. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 345-349.
- 31- Heidari F., Zehtab-Salmasi S., Javanshir A., Aliari H., and Dadpour M.R. 2008. The effect of plant density on yield and production of essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 12: 501-510. (In Persian with English abstract)
- 32- Hekmati M., Hadian J., and Tabaei Aghdae S.R. 2012. Evaluating the effect of planting density on yield and morphology of savory (*Satureja khuzistanica* Jamzad). *Annals of Biological Research* 3: 4017-4022.
- 33- Hosseinpour M., Pirzad A., Habibi H., and Fotokian M.H. 2011. Effect of biological nitrogen fertilizer (*Azotobacter*) and plant density on yield, yield components and essential oil of anise. *Iranian Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 2: 69-86. (In Persian with English abstract)
- 34- Ibrahim H.M. 2012. Response of some sunflower hybrids to different levels of plant density. *APCBEE Procedia* 4: 175-182.
- 35- Karami A., Sepehri A., Hemzei J., and Salimi Gh. 2011. Effect of nitrogen and phosphorous biofertilizers on quantitative and qualitative traits of borage (*Borago officinalis* L.) under water deficit stress. *Plant Production Technology* 11: 37-50. (In Persian with English abstract)

- 36- Khalesro Sh., Ghalavand A., Sefidkon F., and Asgharzadeh A. 2012. The effect of biological and organic inputs on quantity and quality of essential oil and some elements content of anise (*Pimpinella anisum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27: 551-560. (In Persian with English abstract)
- 37- Khandan A., Astaraee A., Nassiri Mahallati M., and Fotovvat A. 2004. Effects of organic and inorganic fertilizers on yield and yield components of *Plantago ovata* Forsk. Iranian Journal of Field Crops Research 3: 245-253. (In Persian with English abstract)
- 38- Koochehi A., Amirmoradi Sh., Shabahang J., and Kalantari Khandani S. 2013. Effect of organic fertilizers on quantitative and qualitative characteristics of *Plantago ovata* Forssk., *Alyssum homolocarpum* L., *Lepidium perfoliatum* L., and *Lalementia iberica* L. Agroecology 5: 16-26. (In Persian with English abstract)
- 39- Lakhdar A., Falleh H., Ouni Y., Oueslati S., Debez A., Ksouri R., and Abdelly Ch. 2011. Municipal solid waste compost application improves productivity, polyphenol content, and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule*. Journal of Hazardous Materials 191: 373-379.
- 40- Liuc J., and Pank B. 2005. Effect of vermicompost and fertility levels on growth and oil yield of Roman chamomile. Scientia Pharmaceutica 46: 63-69.
- 41- Mafakheri S., Omidbaigi R., Sefidkon F., and Rejali F. 2012. Effect of vermicompost, biophosphate and azotobacter on quantity and quality of essential oil of *Dracocephalum moldavica* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27: 596-605. (In Persian with English abstract)
- 42- Mehrabani M., Ghassemi N., Sajjadi S.E., Ghannadi A., and Shams-Ardakani M. 2005. Main phenolic compounds of petals of *Echium amoenum* fisch. And C.A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. Daru 13: 65-69.
- 43- Mir B., Ghanbari A., Ravan S., and Asgharipour M. 2011. Effects of plant density and sowing date on yield and yield components of *Hibiscus sabdarij* in Zabol region. Advances in Environmental Biology 5: 1156-1161.
- 44- Miri H., and Darzi M.T. 2018. Effects of manure and phosphate solubilizing biofertilizer on growth, yield and essential oil quality of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in Firouzkuh region. Iranian Journal of Field Crop Science 49: 35-45. (In Persian with English abstract)
- 45- Moradi R., Nassiri Mahallati M., Rezvani Moghaddam P., Lakzian A., and Nejadali A. 2011. Effect of biological and organic fertilizers on quantitative and qualitative o oil in *Foeniculum vulgare* Mill. Journal of Horticultural Science 25: 25-33. (In Persian with English abstract)
- 46- Motta S.R., and Maggiore T. 2013. Evaluation of nitrogen management in maize cultivation grown on soil amended with sewage sludge and urea. European Journal of Agronomy 45: 59-67.
- 47- Muanda F.N., Soulimani R., Diop B., and Dicko A. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from stevia rebaudiana Bertoni leaves. Journal of Food Science and Technology 44: 1865-1872.
- 48- Nabizadeh E., Habibi H., and Hosainpour M. 2012. The effect of fertilizers and biological nitrogen and planting density on yield quality and quantity *Pimpinella anisum* L. European Journal of Experimental Biology 2: 1326-1336.
- 49- Najafpoor Navaee M. 2002. Evaluation of effect of phosphorous and nitrogen fertilizers on seed yield of *Echium amoenum*. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants 13: 41-50. (In Persian with English abstract)
- 50- Ndabamenye T., Van Asten P.J.A., Blomme G., Vanlauwe B., Swennen R., Annandale J.G., and Barnard R.O. 2013. Ecological characteristics and cultivar influence optimal plant density of East African highland bananas (*Musa* spp., AAA-EA) in low input cropping systems. Scientia Horticulturae 150: 299-311.
- 51- Nemati Darbandi H., Azizi M., Mohammadi S., and Karimpoor S. 2014. Evaluation of effect of foliar spray with different concentrations of vermicompost on morphological traits, essential oil percentage and yield of *Melissa officinalis* L. Iranian Journal of Horticulture Science 27: 411-417. (In Persian with English abstract)
- 52- Niknejad M., Lebaschy M.H., Jaimand K., and Hatami F. 2013. Effect of organic and chemical fertilizers on essential oil of *Matricaria chamomilla* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 29: 373-386. (In Persian with English abstract)
- 53- Nooriyan Soroor E., Rouzbehan Y., and Alipour D. 2013. Effect of *Echium amoenum* extract on the growth rate and fermentation parameters of Mehraban lambs. Animal Feed Science and Technology 184: 49-57.
- 54- Ordone A.A.L. 2008. Antioxidant activities of sechium edule swartz extracts. Journal Agricultural Food Chemistry 97: 452-458.
- 55- Padmavathiamma P.K., Li L.Y., and Kumari U.R. 2008. An experimental study of vermin-biowaste composting for agriculture soil improvement. Bioresource Technology 99: 1672-1681.
- 56- Raja Sekar K., and Karmegan N. 2010. Earthworm casts as an alternate carrier material for biofertilizers: Assessment of endurance and viability of *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum*. Scientia Horticulturae 124: 286-289.
- 57- Rantala P.R., Vaajasaari K., Juvonen R., Schultz E., Joutti A., and Makela-kurtto R. 1999. Composting of forest industry wastewater sludges for agricultural use. Water Science Technology 40: 187-194.
- 58- Ren X., Zhang L., Du M., Evers J.B., Van der Werf W., Tian X., and Li Zh. 2013. Managing mepiquat chloride and plant density for optimal yield and quality of cotton. Field Crops Research 149: 1-10.

- 59- Rezaee M., and Baradaran R. 2011. Effects of biofertilizers on the yield and yield components of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 29: 635-650. (In Persian with English abstract)
- 60- Rezakhani A., and Haj Seyed Hadi M.R. 2017. Effect of manure and foliar application of amino acids on growth characteristics, seed yield and essential oil of coriander (*Coriandrum sativum* L.). Iranian Journal of Field Crop Science 48: 777-786. (In Persian with English abstract)
- 61- Rezvani Moghaddam P., Aminghafuri A., Bakhshaei S., and Jafari L. 2013. Evaluation of effect of biofertilizer and organic fertilizer on some quantitative characteristics and amount of oil of *Satureja hortensis* L. Agroecology 5: 105-112. (In Persian with English abstract)
- 62- Sabahi H., Takafooyan J., Mahdavi Damghani A.M., and Liaghati H. 2010. Effects of integrated application of farmyard manure, plant growth promoting rhizobacteria and chemical fertilizers on production of canola (*Brassica napus* L.) in saline soil of Qum. Agroecology 2: 287-291. (In Persian with English abstract)
- 63- Saglam C., Atakisi I., Turhan H., Kaba S., Arslanoglu F., and Onemli F. 2004. Effect of propagation method, plant density, and age on lemon balm (*Melissa officinalis*) herb and oil yield. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 32: 419-423.
- 64- Salehi A., Ghalavand A., Sefidkon F., and Asgharzade A. 2011. The effect of zeolite, PGPR and vermicompost application on N, P, K concentration, essential oil content and yield in organic cultivation of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 27: 200-214. (In Persian with English abstract)
- 65- Sangwan P., Kaushik C.P., and Garg V.K. 2008. Feasibility of utilization of horse dung spiked filter cake in vermicomposters using exotic earthworm *Eisenia foetida*. Bioresource Technology 99: 2442-2448.
- 66- Sayyah M., Boostani H., Pakseresht S., and Malaieri A. 2009. Efficacy of aqueous extract of *Echium amoenum* in treatment of obsessive-compulsive disorder. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 33: 1513-1516.
- 67- Schiffer M.C., Ronzelli Junior P., and Koehler H.S. 1993. Influence of organic fertilization on the biomass, yield composition of the essential oil of *Achillea millefolium* L. Acta Horticulture 331: 109-114.
- 68- Shamsodin S.M., Maghsudi K., Farahbakhsh H., and Naseralavi M. 2007. Compost and control of soil erosion. 2nd National Congress of Ecological Agriculture, 25-26 October, Iran, Gorgan. (In Persian with English abstract)
- 69- Sharpley A.N., McDowell R., and Kleinman P.J.A. 2004. Amounts, forms, and solubility of phosphorus in soils receiving manure. Soil Science Society of American Journal 68: 2048-2057.
- 70- Shehata S.A., Gharib A.A., Mohamed M., El-Mogy Abdel Gawad K.F., and Emad A.S. 2011. Influence of compost, amino and humic acid on the growth, yield and chemical parameters of strawberries. Journal of Medicinal Plants Research 5: 2304-2308.
- 71- Sheikhpour S., Sirousmehr A., and Fakheri B. 2017. Effect of nitrogen and nitroxin levels on quantitative traits of borage (*Borago officinalis* L.) under Zabol conditions. Journal of Agricultural Crops Production 19: 933-945. (In Persian with English abstract)
- 72- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., and Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 945-948.
- 73- Tabrizi L. 2004. The effect of water stress and manure on yield, yield components and quality characteristics of *Plantago psyllium*. MS Thesis. Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian with English abstract)
- 74- Weber J., Kocowicz A., Bekier J., Jamroz E., Tyszka R., Debicka M., Parylak D., and Kordas L. 2014. The effect of a sandy soil amendment with municipal solid waste (MSW) compost on nitrogen uptake efficiency by plants. European Journal of Agronomy 54: 54-60.

Evaluation of Morphological Characteristics, Quantitative and Qualitative Yield of *Echium amoenum* as Affected by Plant Density and Application of Chemical (Urea) Fertilizer and Different Organic Fertilizers

M.B. Amiri^{1*}– P. Rezvani Moghaddam²– M. Jahan³

Received: 28-01-2018

Accepted: 14-09-2019

Introduction: Maintenance of soil fertility as a permanent bed for continuous production of agricultural products is one of the most important issues affecting the sustainability of food production. In order to achieve healthy food production, application of ecological inputs such as organic fertilizers are inevitable. Organic fertilizers are fertilizer compounds that contain one or more kinds of organic matter. They can improve the soil's ability to hold water and nutrients. They create a beneficial environment for earthworms and microbial organisms that break the soil down into rich, fine humus. Compost is organic matter that has been decomposed and recycled as a fertilizer and soil amendment. Compost can greatly enhance the physical structure of soil. The addition of compost may provide greater drought resistance and more efficient water utilization. Vermicompost is the final product of composting organic material using different types of worms, such as red wigglers or earthworms, to create a homogenized blend of decomposed vegetable and food waste, bedding materials and manure. Vermicompost helps store nutrients and keeps them safe from leaching and irrigation, functioning to balance hormones within plant physiology, and adding beneficial biology to soil. Vermicompost improves soil aeration, enriches soil with micro-organisms (adding enzymes such as phosphatase and cellulase), attracts deep-burrowing earthworms already present in the soil and improves water holding capacity, enhances germination, plant growth and crop yield, improves root growth and structure. Cow manure is an excellent fertilizer containing nitrogen, phosphorus, potassium and other nutrients. It also adds organic matter to the soil which may improve soil structure, aeration, soil moisture-holding capacity, and water infiltration. Plant density is the number of individuals of a given plants that occurs within a given sample unit or study area. Planting density can impact the overall health of plants. Plantings that are too sparse (the density is too low) may be more susceptible to weeds, while planting that are too dense might force plants to compete over scarce nutrients and water and cause stunted growth. Despite of many researches on the effect of organic fertilizers and plant density on different crops, information on the effects of these factors for many medicinal plants is scarce, therefore, in this study effect of organic fertilizers and plant density on morphological characteristics and yield of *Echium amoenum* in a low input cropping system was studied.

Materials and Methods: In order to evaluate the effect of different fertilizers on quantitative characteristics of *Echium amoenum* at different plant densities, a factorial experiment based on RCBD design with three replications was conducted in 2011-2013 growing seasons, in Ferdowsi University of Mashhad, Iran. Experimental factors included three plant densities (10, 5 and 3 plant per m²) and five different types of organic and chemical fertilizers (municipal waste compost, vermicompost, cow manure, chemical (urea) fertilizer and control).

Results and Discussion: The results showed that with reduction of plant density, effect of organic fertilizers on increasing the flower yield was exacerbated and at the lowest density, municipal waste compost, vermicompost and cow manures increased flower yield 112, 79 and 223% compared to control, respectively. In all studied densities, length of lateral branches in conditions of organic fertilizers application was more than control. Municipal waste compost, vermicompost, cow manure and chemical fertilizer increased total phenol 106, 54, 66 and 173% compared to control, respectively. In plant mean density (5 plant per m²), application of municipal waste compost, vermicompost and cow manure increased total anthocyanin 83, 74 and 57% compared to control, respectively. In general, result of this study showed that application of organic and chemical fertilizers at optimal plant densities, can improve growth characteristics and quantitative and qualitative yield of *Echium*

1- Assistant Professor, Department of Plant Production, University of Gonabad

(*- Correspondin Author Email: amiri@gonabad.ac.ir)

2 and 3- Professor and Associate Professor, Department of Agrotechnology, Ferdowsi University of Mashhad

amoenum. Organic fertilizers are the most significant resources for development of agricultural soil quality and increase in the yield of different medicinal plants. It has been reported that this ecological inputs provide favorable conditions for plant growth and development through improvement of physical, chemical and biological properties of the soil, therefore, it can be concluded that improvement of the most studied traits in the present study were due to use of organic fertilizers. Fallahi et al., (20) have reported the positive effects of organic fertilizers on the improvement of quantitative and qualitative characteristics in chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). It seems that plants compete with each other over scarce nutrients and water in high plant density and cause stunted growth. Some other studies have reported that suitable plant density can increase the growth and yield of some medicinal plants such as coriander (*Coriandrum sativum* L.), Ajwain (*Carum copticum* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and anise (*Pimpinella anisum* L.).

Conclusion: In general, results of this study showed that application of organic and chemical fertilizers at optimal plant densities, while improving growth and yield characteristics of *Echium amoenum* flower can be ensured health of production of this important medicinal plant.

Keywords: Compost, Ecofriendly input, Medicinal plant, Total anthocyanin, Total phenol

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.73637

می گیرد اما راندمان تولید با این روش پایین است چرا که گیاه کند رشد و برای تشکیل غده و ریشه به مدت زمان حدود ۷ ماه نیاز است علاوه بر این به دلیل نیاز محیطی گرم و مرطوب، تکثیر به فصل تابستان محدود می شود لذا کشت بافت بهترین راه برای تکثیر سریع و دستیابی به تعداد زیاد گیاه با ساختار ژنتیکی یکسان و همچنین حذف بیماری ها در کوتاه مدت بوده و کاهش هزینه ها و امکان برنامه ریزی از نظر زمان بندی برای تولید و تعداد را دارا می باشد. سنویراتن و همکاران (۱۴) آزمایشی را به منظور تسریع در ازدیاد گیاه زامیفولیا انجام دادند و انواع قلمه های رویشی را در محیط مایع (آب مقطر) و یک محیط جامد جدید با مواد مغذی، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که محل اتصال برگ به دمبرگ به عنوان بهترین نوع برش برای تکثیر سریع تشخیص داده شد و سوبسترای جامد برای ریشه زایی سریعتر از محیط مایع بود. کانتون و همکاران (۱۶) در تحقیقی از ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه جوان زامیفولیا برای کشت بافت استفاده کردند. محیط کشت پایه^۱ MS^۱ به همراه ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی گرم بر لیتر BA^۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D^۳ در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی را مناسب برای کالوس زایی تشخیص دادند. نیکوای (۱۰) در سه مرحله کشت بافت زامیفولیا از ریزنمونه های برگ و شاخه های ظریف گیاه استفاده کرد. مرحله اول به منظور القای کالوس، محیط کشت شامل اجزای MS با هورمون های ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA^۴ و در دمای ۲۶-۲۲ درجه سانتی گراد به میزان نور ۱۵۰۰-۱۲۰۰ LX مناسب تشخیص داده شد و بعد از ۱۵ روز کالوس تشکیل شد. در مرحله دوم محیط کشت مناسب برای جوانه زنی شامل اجزای MS به همراه ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA تشخیص داده شد که بعد از ۳۰ روز، تعداد زیادی جوانه های تمایز یافته رشد کردند و در مرحله سوم محیط کشت مناسب برای ریشه زایی شامل اجزا MS^۱ به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA بود. شی هپینگ و لیانگ (۱۵) در تحقیقی با بررسی سطوح مختلف تنظیم کننده ها، محیط کشت MS به همراه BA، 2,4-D و PVP^۵ به ترتیب ۱، ۲ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر را برای کالوس زایی و محیط کشت MS به همراه NAA و BA هر کدام به ترتیب ۰/۲ و ۳ میلی گرم بر لیتر برای شاخه زایی و محیط کشت MS^۱ به همراه NAA و BA به ترتیب ۰/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر برای ریشه زایی گیاه زامیفولیا بهترین تیمار تشخیص دادند. پاپاتیو و همکاران (۱۱) با بررسی تأثیر غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد در ریز ازدیادی گیاه زامیفولیا که از سطوح

مختلف هورمون های 2,4-D و BA و NAA در محیط کشت MS استفاده کردند و بهترین نتیجه از BA و NAA برای رسیدن به گیاهچه کامل به ترتیب ۲/۶ و ۲/۲۲ میکرومول تعیین گردید. پان ژو و همکاران (۱۲) ریزنمونه ها را در محیط کشت جامد MS که حاوی NAA و یا BA در غلظت های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) کشت دادند و گزارش کردند که بهترین روش برای القاء کالوس، حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA بوده است. با توجه به نوع بافت، مشخص شد که کالوس به وجود آمده از ریزنمونه دمبرگ به طور متوسط به اندازه ۱/۴۲ سانتی متر مربع است که بزرگتر از ریزنمونه برگ با اندازه متوسط ۰/۶ سانتی متر مربع بود. هدف از این مطالعه مقایسه ریزنمونه های مختلف از نظر کالوس زایی و باززایی در محیط کشت با سطوح مختلف هورمونی برای تولید و تکثیر سریعتر گیاه زامیفولیا می باشد.

مواد و روش ها

ضد عفونی ریزنمونه ها

در این مطالعه ریزنمونه های تهیه شده برای آزمایش اول شامل ریزوم و دمبرگ و ریزنمونه ها برای آزمایش دوم برگ و شاخه می باشد. برای ضد عفونی ابتدا ریزنمونه ها با آب معمولی شسته شدند سپس به طور جداگانه در محلول آب و چند قطره توتین به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از آبکشی نمونه ها با آب مقطر، ریزنمونه های برگ و دمبرگ به مدت ۳۰ ثانیه، ریزنمونه شاخه به مدت ۵۰ ثانیه و ریزنمونه ریزوم به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و پس از آبکشی سطحی مجدد با آب مقطر، ریزنمونه های برگ و دمبرگ به مدت ۳ دقیقه، ریزنمونه شاخه به مدت ۵ دقیقه و ریزنمونه ریزوم به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد قرار داده شدند و پس از آبکشی سطحی سوم با آب مقطر، ریزنمونه های برگ و دمبرگ به مدت ۲ دقیقه و ریزنمونه های شاخه و ریزوم به ترتیب به مدت ۳ و ۵ دقیقه به محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد منتقل شده و در انتها پس از آبکشی با آب مقطر به ظرف حاوی آب مقطر استریل شده به مدت ۵ دقیقه منتقل شدند.

کشت ریزنمونه

ریزنمونه های ضد عفونی شده برای کشت در دو آزمایش جداگانه آماده شدند.

آزمایش اول: کالوس و باززایی ریزنمونه های ریزوم و دمبرگ

ریزنمونه های ریزوم و دمبرگ در سه تکرار در محیط کشت MS

- 1- Murashige and Skoog medium
- 2- Benzyl adenine
- 3- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
- 4- Naphthalene acetic acid
- 5- Polyvinyl pyrrolidone

آماري با نرم افزارهاي SPSS نسخه ۲۲ و MSTAT-C مورد تجزيه آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول

درصد کالوس‌زایی

نتایج نشان داد که اثر ریزنمونه بر روی درصد کالوس‌زایی تأثیرگذار است. برهمکنش شدید فاکتورها در آزمایش نشان داد که بررسی تأثیر سطوح هورمون‌های اکسین و سایتوکینین به طور جداگانه بر کالوس‌زایی نمی‌تواند مفید واقع گردد لذا انتخاب بهترین برهمکنش برای ریز نمونه‌ها نتیجه مناسب‌تری را برای درصد کالوس‌زایی به همراه خواهد داشت. بهترین برهمکنش برای درصد کالوس‌زایی ریزنمونه ریزوم مربوط به تیمارهای هورمونی ۴ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با ۵۵ درصد کالوس‌زایی و کمترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ با غلظت هورمونی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰ میلی گرم بر لیتر BA با ۲/۵٪ مشاهده گردید که با افزایش BA درصد کالوس‌زایی در این ریزنمونه به ۴۴/۵ درصد درصد رسید (جدول ۱).

مدت زمان تا شروع کالوس‌زایی

نتایج نشان داد که غلظت بالای سایتوکینین در هردو ریز نمونه ریزوم و دمبرگ سرعت کالزایی را افزایش می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود افزایش هورمون BA در هر دو ریزنمونه ریزوم و دمبرگ در کاهش مدت زمان تا شروع کالوس‌زایی نقش داشته و برهمکنش ۴ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه ریزوم با ۱۸ روز و همچنین ۴ میلی گرم بر لیتر BA و ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه دمبرگ با ۱۸/۵ روز کوتاه‌ترین در نتیجه بهترین تیمارها در سرعت کالزایی می‌باشند (جدول ۱).

وزن تر کالوس

بیشترین وزن کالوس در آزمایش اول مربوط به ۴ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه ریزوم با ۱/۸۵۰ گرم بود در ریزنمونه دمبرگ ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۲ میلی گرم 2,4-D با ۱/۳۵۰ گرم بیشترین وزن کالوس را نشان داد که می‌توان نتیجه گرفت دلیل برهمکنش شدید بین سطوح هورمونی اکسین و سایتوکینین با ریزنمونه‌ها، سطوح متفاوت هورمونی در ریز نمونه‌های ریزوم و دمبرگ عکس‌العمل متفاوتی را برای وزن تر کالوس نشان داده‌اند (جدول ۱).

۱/۲ در ترکیب با BA (۰، ۲، ۴ میلی گرم بر لیتر و 2,4-D (۰، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر (به همراه ویتامین‌ها شامل تیامین، نیکوتینک اسید، پیروکسین گلايسين و مايو اينستول و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۵ گرم در لیتر آگار و PH تنظیم شده برابر با ۵/۸ کشت شدند. ریزنمونه‌های کشت شده جهت کالوس‌زایی تحت شرایط دمایی ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس جهت تمایز شاخه و ریشه، کالوس‌های ایجاد شده از ریزوم و دمبرگ در سه تکرار در محیط کشت 1/2MS حاوی هورمون‌های BA (۰، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر) و 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر) برای شاخه‌زایی و پس از مشاهده جوانه‌های شاخه و برگ به محیط کشت 1/2MS حاوی هورمون‌های BA (۰، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر) و NAA (۰، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر) برای ریشه‌زایی انتقال یافتند.

آزمایش دوم: کالوس و باززایی ریزنمونه‌های برگ و شاخه

ریزنمونه‌های برگ و شاخه در محیط کشت MS 1/2 در ترکیب با BA (۰، ۲، ۴ میلی گرم بر لیتر و NAA (۰، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر) به همراه ویتامین‌ها، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۵ گرم در لیتر آگار و PH تنظیم شده برابر با ۵/۸ کشت شدند. ریزنمونه‌های کشت شده جهت کالوس‌زایی تحت شرایط دمایی ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. مدت زمان رسیدن به کالوس ثبت شد و پس از ۵ هفته درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس اندازه‌گیری گردید. سپس جهت تمایز شاخه و ریشه، کالوس‌های ایجاد شده از برگ و شاخه روی محیط کشت 1/2MS حاوی هورمون‌های BA (۰، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر) و NAA (۰، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر) برای شاخه‌زایی و پس از مشاهده جوانه‌های شاخه و برگ به محیط کشت 1/2MS حاوی هورمون‌های BA (۰، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر) و NAA (۰، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر) برای ریشه‌زایی انتقال داده شدند.

صفات ثبت شده در هر دو آزمایش در مرحله کالوس‌زایی شامل مدت زمان تا شروع کالوس‌زایی، درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس و در مرحله باززایی شامل مدت زمان تا شاخه‌زایی، طول شاخه، تعداد برگ و همچنین مدت زمان تا ریشه‌زایی بود. صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس، طول و تعداد برگ پس از ۵ هفته انتقال به محیط کشت اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتورها شامل ریزنمونه، تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین بود. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های

مدت زمان تا شروع شاخه‌زایی

نتایج بیانگر این موضوع که افزایش سرعت شاخه‌زایی نتیجه برهمکنش سطوح هورمون‌های سایتوکینین و اکسین در ریزنمونه‌ها است و توازن بین هورمون‌ها منجر به کاهش مدت زمان تا شروع شاخه‌زایی خواهد بود و بررسی جداگانه روند هر یک از هورمون‌ها در ریزنمونه‌ها نمی‌تواند کارایی داشته باشد. مقایسه میانگین‌ها در آزمایش اول نشان داد که استفاده از هورمون 2,4-D به تنهایی مدت زمان تا شاخه‌زایی را افزایش می‌دهد بطوری‌که ریزنمونه ریزوم با ۲۹/۵ روز و ریزنمونه دمبرگ با ۲۸ روز بیشترین مدت زمان را برای رسیدن به شاخه‌زایی نشان دادند. کوتاه‌ترین زمان رسیدن به شاخه مربوط به تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه ریزوم با ۱۲ روز اختصاص یافت لذا تیمار مناسبی برای تسریع در باززایی بود (جدول ۱).

طول شاخه

نتایج باززایی برای طول شاخه نیز نشان داد که بدلیل برهمکنش شدید بین سطوح هورمون‌ها و ریز نمونه‌ها، بررسی روند هورمون‌ها به طور جداگانه نمی‌تواند کارایی لازم را برای رسیدن به حداکثر طول نو شاخه داشته باشد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بلندترین طول شاخه مربوط به تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه ریزوم با میانگین ۴/۱۰ سانتی‌متر می‌باشد و با تیمارهای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه‌های ریزوم و دمبرگ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد یعنی با کاهش سایتوکینین (BA) از ۴ به ۲ میلی‌گرم هم نتیجه مطلوب به دست آمد (جدول ۱).

تعداد برگ

تعداد برگ حاصل از ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۵ هفته قرارگیری در محیط کشت نیز متأثر از برهمکنش بین فاکتورها بود و توازن بین سطوح هورمون‌های سایتوکینین و اکسین منجر به ایجاد حداکثر برگ در محیط کشت باززایی گردید. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد برگ مربوط به تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ریزنمونه ریزوم با میانگین تعداد ۵/۵ برگ است (جدول ۱).

مدت زمان تا شروع ریشه‌زایی

برهمکنش شدید بین سطوح هورمونی و ریزنمونه‌ها بیانگر این موضوع است که بررسی جداگانه هورمون‌ها برای رسیدن به کوتاه ترین زمان تا ریشه‌زایی بی‌فایده است. داده‌های ثبت شده نشان می‌دهد که عدم حضور سایتوکینین باعث افزایش مدت زمان تا

ریشه‌زایی می‌شود. کوتاه‌ترین زمان برای ریشه‌زایی پس از انتقال ریزنمونه‌های باززایی شده به همراه شاخه و حداقل دو برگ به محیط کشت ریشه‌زایی، مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA برای ریزنمونه دمبرگ با مدت زمان تا شروع ریشه‌زایی ۱۴ روز بود (جدول ۱).

آزمایش دوم

درصد کالوس‌زایی

برهمکنش فاکتورها همانند آزمایش اول نشان داد که بررسی تأثیر سطوح هورمون‌های اکسین و سایتوکینین به طور جداگانه بر کالوس‌زایی نمی‌تواند مفید واقع گردد لذا انتخاب بهترین برهمکنش برای ریز نمونه‌ها نتیجه مناسب‌تری را برای درصد کالوس‌زایی به همراه خواهد داشت. نتایج آزمایش نشان داد که برهمکنش ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه‌های برگ و شاخه به ترتیب با ۹۴/۵ درصد و ۷۹ درصد، بالاترین درصد کالوس‌زایی را به خود اختصاص داده‌اند که در مقایسه با ریزنمونه‌های دمبرگ و ریزوم در آزمایش اول از درصد کالوس‌زایی بیشتری برخوردار هستند. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که در مقدار ثابت BA افزایش غلظت NAA به طور معنی‌داری درصد کالوس‌زایی را افزایش می‌دهد (جدول ۲).

مدت زمان تا شروع کالوس‌زایی

تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه‌های برگ و شاخه به ترتیب با ۱۴ و ۱۶/۵ روز، بهترین برهمکنش برای این صفت تشخیص داده شدند (جدول ۲). مقایسه دو آزمایش بیانگر سرعت کالزایی بیشتر ریزنمونه‌های برگ و شاخه نسبت به ریزنمونه‌های دمبرگ و ریزوم می‌باشد.

وزن تر کالوس

در آزمایش دوم نیز همانند آزمایش اول برهمکنش شدیدی بین سطوح هورمونی اکسین و سایتوکینین با ریزنمونه‌ها مشاهده گردید بطوری‌که سطوح متفاوت هورمونی در ریز نمونه‌های شاخه و برگ عکس‌العمل متفاوتی را برای وزن تر کالوس نشان دادند (جدول ۱). بیشترین وزن کالوس با غلظت هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریز نمونه‌های شاخه و برگ به ترتیب با ۱/۶۵ و ۱/۱ گرم ثبت گردید (جدول ۲).

مدت زمان تا شروع شاخه‌زایی

در آزمایش دوم، در سطوح هورمونی مشابه اکسین و سایتوکینین،

منجر به ایجاد حداکثر برگ در محیط کشت باززایی گردید. بررسی برهمکنش‌ها بیشترین تعداد برگ را به تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه برگ با میانگین تعداد ۸ برگ را نشان داد (جدول ۲). نتایج آزمایش بیانگر کاهش تعداد برگ در زمان استفاده از اکسین به تنهایی بود.

مدت زمان تا شروع ریشه‌زایی

پس از انتقال ریزنمونه‌های باززایی شده به همراه شاخه و حداقل دو برگ به محیط کشت ریشه‌زایی، مدت زمان تا شروع ریشه‌زایی محاسبه گردید. نتایج نشان داد که این زمان متأثر از برهمکنش بین فاکتورها بوده و توازن بین سطوح هورمون‌های سایتوکینین و اکسین منجر به کاهش زمان گردید. داده‌های ثبت شده نشان می‌دهد که عدم حضور سایتوکینین باعث افزایش مدت زمان تا ریشه‌زایی می‌شود. کوتاه‌ترین زمان تا ریشه‌زایی مربوط به تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA و برای ریزنمونه برگ با ۱۷/۵ روز بود (جدول ۲).

ریزنمونه برگ قابلیت بیشتری را در کوتاه کردن زمان شاخه‌زایی نسبت به ریزنمونه شاخه از خود نشان داد (جدول ۱). بررسی برهمکنش‌ها نشان داد که تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه‌های برگ و شاخه به ترتیب با ۱۰/۵ و ۱۲/۵ روز کوتاه‌ترین زمان رسیدن به شاخه‌زایی را دارا می‌باشند (جدول ۲).

طول شاخه

مقایسه میانگین‌ها در آزمایش دوم نشان داد که بلندترین طول شاخه مربوط به تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه برگ با میانگین ۴/۱۰ سانتی متر می‌باشد (جدول ۲).

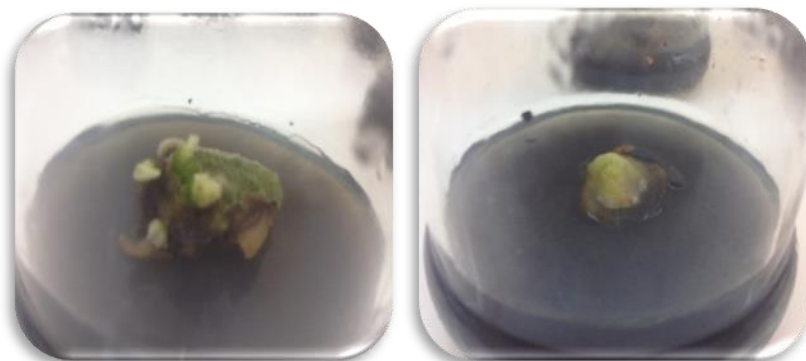
تعداد برگ

تعداد برگ حاصل از ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۵ هفته قرارگیری در محیط کشت نیز همانند آزمایش اول متأثر از برهمکنش بین فاکتورها بود و توازن بین سطوح هورمون‌های سایتوکینین و اکسین



شکل ۱- کالوس ایجاد شده از دم‌برگ گیاه زامیفولیا

Figure 1- Produced callus from the petioles of *Zamioculcas zamiifolia*



شکل ۲- کالوس ایجاد شده از ریزوم گیاه زامیفولیا

Figure 2- Produced callus from rhizomes of *Zamioculcas zamiifolia*

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات مختلف BA, NAA و 2,4-D بر برخی صفات تولید کالوس و باززایی شاخه از دو ریزنمونه ریزوم و دمبرگ گیاه زامیفولیا

Table 1- Mean comparison of the effect of BA, NAA and 2, 4-D combinations on some traits of callus production and shoot regeneration from rhizome and petiole explants of *Zamioculcas zamiifolia*

تیمار Treatment	صفات موردآزمایی Measured traits					
	درصد کالوس زایی Calogenesis Percentage (%)	مدت زمان تا شروع کالوس‌زایی Time to start calogenesis (day)	وزن تر کالوس Fresh weight of callus (g)	مدت زمان تا شروع شاخه‌زایی Time to start shootming (day)	طول شاخه Shoot length (cm)	تعداد برگ Num ber of leave s
						مدت زمان تا شروع ریشه‌زایی Time to start Rooting (day)
0 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))						
0 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))						
0 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	0.0 ^g	0.0 ^g	0.00 ^g	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f
0 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	0.0 ^g	0.0 ^g	0.00 ^g	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f
0 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	3.0 ^f	37.5 ^a	0.35 ^f	29.5 ^a	0.85 ^d	3.5 ^c
0 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	3.5 ^f	33.0 ^c	0.25 ^f	28.0 ^a	0.55 ^e	2.5 ^d
2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	4.0 ^f	35.5 ^b	0.45 ^{ef}	25.5 ^c	1.00 ^{cd}	3.5 ^c
2 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	6.5 ^e	37.0 ^a	0.50 ^e	26.5 ^c	0.75 ^d	3.0 ^c
2 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	2.0 ^f	28.5 ^d	0.25 ^f	19.5 ^d	2.24 ^c	4.5 ^b
2 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	2.5 ^f	31.5 ^c	0.30 ^f	21.0 ^d	2.00 ^c	4.0 ^b
2 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	24.5 ^d	33.0 ^c	0.65 ^e	13.5 ^f	4.05 ^a	4.0 ^b
2 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	32.5 ^c	22.0 ^e	0.85 ^d	14.0 ^f	4.05 ^a	3.5 ^c
2 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	21.5 ^d	30.5 ^{cd}	1.60 ^b	17.0 ^{de}	2.45 ^c	2.5 ^d
2 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	31.5 ^c	25.5 ^d	1.35 ^{bc}	17.0 ^{de}	2.10 ^c	1.5 ^e
2 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	4.5 ^f	28.0 ^d	0.25 ^{bd}	15.5 ^e	3.20 ^b	4.0 ^b
4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	5.5 ^e	30.5 ^{cd}	0.65 ^e	16.5 ^e	3.15 ^b	2.5 ^d
4 mg/l BA+0 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	55.0 ^a	18.0 ^f	1.85 ^a	12.0 ^g	4.10 ^a	5.5 ^a
4 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	44.5 ^b	21.5 ^e	1.06 ^c	13.5 ^f	3.85 ^b	4.0 ^b
4 mg/l BA+1 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))	10.0 ^{df}	27.0 ^d	0.53 ^e	17.0 ^{de}	2.05 ^c	2.5 ^d
4 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + ریزوم (rhizome))	22.0 ^d	18.5 ^f	0.75 ^d	15.5 ^e	2.10 ^c	1.0 ^e
4 mg/l BA+2 mg/l 2,4-D + دمبرگ (petiole))						
0 mg/l BA+0 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	—	—	—	—	—	0.0 ^g
0 mg/l BA+0 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))						
0 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))						
0 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))						
0 mg/l BA+1 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	0.0 ^g
0 mg/l BA+1 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	21.5 ^c
1 mg/l BA+0 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	18.0 ^d
1 mg/l BA+0 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	23.0 ^b
1 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	21.0 ^c
1 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	24.5 ^b
1 mg/l BA+1 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	23.0 ^b
1 mg/l BA+1 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	15.5 ^{ef}
1 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	14.0 ^f
1 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	24 ^b
1 mg/l BA+1 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	22.5 ^{bc}
1 mg/l BA+1 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	25.5 ^{ab}
2 mg/l BA+0 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	26.0 ^a
2 mg/l BA+0 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	16.5 ^e
2 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	17.0 ^e
2 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))	--	--	--	--	--	21.5 ^c
2 mg/l BA+1 mg/l NAA + ریزوم (rhizome))	--	--	--	--	--	19.5 ^d
2 mg/l BA+1 mg/l NAA + دمبرگ (petiole))						

میانگین‌های باحروف مشترک در هر ستون براساس آزمون چنددامنه ای دانکن از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

Means with similar letters in each column are not significantly different base on Duncan's multiple range test ($p < 0.01$).



شکل ۳- باززایی شاخه از ریزوم گیاه زامیفولیا

Figure 3- Regenerated shoots from rhizomes of *Zamioculcas zamiifolia*



شکل ۴- کالوس ایجاد شده از برگ گیاه زامیفولیا

Figure 4- Produced callus from the leaves of *Zamioculcas zamiifoli*



شکل ۵- کالوس ایجاد شده از شاخه گیاه زامیفولیا

Figure 5- Produced callus from the shoot of *Zamioculcas zamiifoli*



شکل ۶- باززایی از برگ گیاه زامیفولیا

Figure 6- Regenerated shoots fromleaves of *Zamioculcas zamiifolia*

جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر ترکیبات مختلف BA و NAA بر برخی صفات تولید کالوس و باززایی از دو ریزنمونه برگ و شاخه گیاه زامیفولیا
Table 2- Mean comparison of the effect of BA and NAA in combinations on some traits of callus production and regeneration from leaf and shoot explants of *Zamioculcas zamiifolia*

تیمار Treatment	درصد کالوس Calogenesis percentage (%)	مدت زمان تا شروع Time to start calogenesis (day)	وزن تر کالوس Fresh weight of callus (g)	مدت زمان تا شروع Time to start shooting (day)	طول شاخه Shoot length (cm)	تعداد برگ Number of leaves	مدت زمان تا شروع Time to start rooting (day)
0 mg/l BA+0 mg/l NAA + برگ(leaf)	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	0.0 ^g
0 mg/l BA+0 mg/l NAA + شاخه(shoot)	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	0.0 ^g
0 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + برگ(leaf)	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	35.0 ^a	1.50 ^{de}	3.5 ^e	--
0 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + شاخه(shoot)	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	37.0 ^a	1.35 ^e	2.0 ^e	--
0 mg/l BA+1 mg/l NAA + برگ(leaf)	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	24.5 ^c	1.75 ^d	4.0 ^{de}	21.5 ^d
0 mg/l BA+1 mg/l NAA + شاخه(shoot)	0.0 ^h	0.0 ^f	0.0 ^f	25.5 ^c	1.65 ^d	3.5 ^e	24.0 ^b
0 mg/l BA+2 mg/l NAA + برگ(leaf)	--	--	--	--	--	--	24.5 ^{ab}
0 mg/l BA+2 mg/l NAA + شاخه(shoot)	--	--	--	--	--	--	24.0 ^b
1 mg/l BA+0 mg/l NAA + برگ(leaf)	--	--	--	19.5 ^e	2.40 ^c	5.5 ^d	25.5 ^a
1 mg/l BA+0 mg/l NAA + شاخه(shoot)	--	--	--	21.0 ^d	1.95 ^d	3.5 ^e	25.5 ^a
1 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + برگ(leaf)	--	--	--	17.5 ^d	2.65 ^c	7.5 ^b	--
1 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + شاخه(shoot)	--	--	--	17.0 ^f	2.50 ^c	5.5 ^d	--
1 mg/l BA+1 mg/l NAA + برگ(leaf)	--	--	--	20.5 ^{de}	1.85 ^d	7.0 ^b	19.5 ^e
1 mg/l BA+1 mg/l NAA + شاخه(shoot)	--	--	--	21.5 ^d	1.70 ^d	4.5 ^{de}	19.5 ^e
1 mg/l BA+2 mg/l NAA + برگ(leaf)	--	--	--	--	--	--	21.0 ^d
1 mg/l BA+2 mg/l NAA + شاخه(shoot)	--	--	--	15.5 ^f	--	--	22.5 ^c
2 mg/l BA+0 mg/l NAA + برگ(leaf)	5.5 ^f	18.0 ^c	0.33 ^e	16.5 ^f	3.20 ^b	6.5 ^c	24.5 ^{ab}
2 mg/l BA+0 mg/l NAA + شاخه(shoot)	4.0 ^f	27.0 ^b	0.27 ^e	10.5 ^h	3.15 ^b	6.5 ^c	25.0 ^a
2 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + برگ(leaf)	53.5 ^d	19.0 ^c	0.82 ^d	12.5 ^g	4.10 ^a	8.0 ^a	--
2 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + شاخه(shoot)	73.5 ^b	26.0 ^b	0.94 ^d	13.5 ^g	3.25 ^b	7.5 ^b	--
2 mg/l BA+1 mg/l NAA + برگ(leaf)	94.5 ^a	14.0 ^e	1.10 ^b	15.5 ^f	4.00 ^a	6.5 ^c	17.5 ^f
2 mg/l BA+1 mg/l NAA + شاخه(shoot)	79.0 ^b	16.5 ^d	1.65 ^a	--	2.60 ^c	6.5 ^c	19.0 ^e
2 mg/l BA+2 mg/l NAA + برگ(leaf)	--	--	--	--	--	--	22.0 ^c
2 mg/l BA+2 mg/l NAA + شاخه(shoot)	--	--	--	--	--	--	23.0 ^c
4 mg/l BA+0 mg/l NAA + برگ(leaf)	2.5 ^g	21.5 ^{bc}	0.36 ^e	--	--	--	--
4 mg/l BA+0 mg/l NAA + شاخه(shoot)	1.5 ^g	27.5 ^b	0.45 ^e	--	--	--	--
4 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + برگ(leaf)	30.0 ^e	29.0 ^a	0.92 ^d	--	--	--	--
4 mg/l BA+0.5 mg/l NAA + شاخه(shoot)	46.5 ^e	29.5 ^a	1.02 ^c	--	--	--	--
4 mg/l BA+1 mg/l NAA + برگ(leaf)	66.5 ^c	28.0 ^{ab}	1.09 ^c	--	--	--	--
4 mg/l BA+1 mg/l NAA + شاخه(shoot)	44.5 ^e	26.0 ^b	0.97 ^d	--	--	--	--

میانگین‌های باحروف مشترک در هر ستون براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

Means with similar letters in each column are not significantly different base on Duncan's multiple range test ($p < 0.01$)

متفاوت بوده است. در هر دو آزمایش مربوط به کالوس‌زایی در هر چهار ریزنمونه القای کالوس مشاهده گردید که القای کالوس در آزمایش اول در ریزنمونه ریزوم و در آزمایش دوم در ریزنمونه برگ به مراتب بیشتر بوده است. بطور کلی بین تمام تیمارها، ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه برگ بالاترین درصد کالوس‌زایی را به همراه کوتاه‌ترین زمان تا رسیدن به کالوس دارا بود. ونیز کانتون و همکاران (۱۵) ریزنمونه‌های

در این تحقیق ریزنمونه‌های دمبرگ و ریزوم در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BA و 2,4-D بعد از ۱۸ روز و ریزنمونه‌های برگ و شاخه در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده های رشد گیاهی BA و NAA بعد از گذشت ۱۴ روز به القای کالوس واکنش نشان دادند. به طور کلی کنترل فرایند کالوس‌زایی بستگی به حضور اکسین و سایتوکینین داشته و توازن بین آن‌ها تولید کالوس را سبب می‌شود. رشد کالوس در یک گونه گیاهی براساس نوع ریزنمونه

و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر NAA، ۵ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA تشخیص دادند در حالی که در تحقیق حاضر تیمار ۴ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D برای ریزنمونه دمبرگ و تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA برای ریزنمونه برگ برای شاخه‌زایی و تیمارهای ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA برای ریزنمونه دمبرگ و تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه برگ برای ریشه‌زایی تشخیص داده شد. لین وی و همکاران (۷) در ریز نمونه برگ محیط کشت MS با تنظیم کننده‌های ۵ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی گرم بر لیتر NAA را برای شاخه‌زایی و محیط کشت MS به همراه تنظیم کننده‌های ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۳ میلی گرم بر لیتر NAA را برای ریشه‌زایی مناسب تشخیص دادند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه تکثیر گیاه ارزشمند زینتی زامیفولیا به روش سنتی از طریق قلمه و ریزوم صرفه اقتصادی ندارد، روش کشت بافت به دلیل تکثیر سریع، یکنواخت و به تعداد زیاد می‌تواند جایگزین مناسبی باشد لذا در مطالعه حاضر به منظور بهینه‌سازی کشت بافت عوامل ریزنمونه و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد، مورد بررسی و تأثیر بارز آن در واکنش به القای کالوس و باززایی در گیاه زامیفولیا مشاهده گردید. در کل برای کالوس‌زایی تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه برگ و در مرحله باززایی برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی، به ترتیب تیمارهای ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه برگ و ۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA برای ریزنمونه دمبرگ مناسب تشخیص داده شد.

برگ و دمبرگ را روی محیط کشت MS ۱/۲ حاوی تنظیم کننده‌های رشد با ترکیب ۰/۲ میلی گرم بر لیتر BA و ۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D در تاریکی و در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد بهترین کشت اعلام کردند و ۴-۵ هفته بعد از کشت، کالوس مشاهده گردید. اما در این تحقیق با بررسی هورمون 2,4-D مشاهده گردید که با افزایش غلظت 2,4-D با مشکل اندام‌زایی نافر و نابجا در مرحله کالوس‌زایی مواجه می‌شویم که باعث کاهش درصد کالوس‌زایی می‌گردد. گو لیوهونگ و همکاران (۵) در مؤسسه تحقیقاتی و بیوتکنولوژی هایکو روی کشت بافت گیاه زامیفولیا تحقیقی را انجام دادند. با بررسی سطوح مختلف از هورمون‌های 2,4-D، NAA، BA تعیین گردید که محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد ۱ میلی گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی گرم بر لیتر BA برای کالوس‌زایی مناسب‌ترین تیمار است. در این تحقیق نیز از نتایج چنان برآمد که این ترکیب هورمونی برای ریزنمونه برگ در محیط کشت MS ۱/۲ بالاترین درصد کالوس‌زایی را داشته است. ژو چون لی و همکاران (۱۷) و لوپز و همکاران (۹) ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی گرم BA به همراه ۰/۵ میلی گرم NAA در ریز نمونه برگ را بهترین شرایط برای اندازه کالوس دانست. ریزنمونه‌های دمبرگ و ریزوم در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BA و 2,4-D و ریزنمونه‌های برگ و شاخه در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BA و NAA بعد از گذشت ۱۰ روز نسبت به اندام‌زایی و تولید شاخه و برگ واکنش نشان دادند. نتایج نشان داد که جهت شاخه‌زایی حضور اکسین و سائتوکنین و توازن بین آن‌ها تولید برگ و شاخه را سبب می‌شود. به طوری که از نتایج چنین برآمد که برهم خوردن این تعادل باعث کاهش کمی و کیفی برگ و شاخه می‌گردد. ژو چون هو و همکاران (۱۸) بهترین محیط کشت را برای کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های دمبرگ و برگ، محیط کشت MS ۱/۲ حاوی تنظیم کننده‌های رشد با ترکیب هورمونی به ترتیب ۳ میلی گرم بر لیتر BA

منابع

- 1- Bejoy M., Sumitha V., and Anish N.P. 2008. Foliar regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort.cv.Agnihothri. Biotechnology 71 (1): 134-138.
- 2- Chen J., Henny R.J., and McConnell D.B. 2002. Development of new foliage plant cultivars. In: J.J. Janik and A. Whipkey (Eds), Trends in New Crops and New Uses, ASHS Press, Alexandria, Pp. 466-472.
- 3- Chen J.J., and Henny R.J. 2003. ZZ: A unique tropical ornamental foliage plant. HortTechnology 13 (3): 458-462.
- 4- Feng C.T., Ho W.C., and Chao Y.C. 2006. Basal petiole rot and plant kill of *Zamioculcas zamiifolia* caused by *Phytophthora nicotianae*. Plant Disease 90: 1107-1109.
- 5- GU L., Yang B., Zhang S., and Yang X. 2006. Tissue culture of *Zamioculcas zamiifolia* (loddiges) angler. Chinese Journal of Tropical Agriculture 32: 19-25.
- 6- Harrison M. 2009. The Incredible ZZ plant (*Zamioculcas zamiifolia*). Available from www.davesgarden.com. Accessed on 14 August 2012.
- 7- Lin W., Tao J., Li Q., Li W., and Huang L. 2005. Study on Rapid Propagation Techniques of *Zamioculcas zamiifolia*. Chinese Agricultural Science Bulletin 44: 86-93.
- 8- Lopez R.G., Blanchard M.G. 2007. ZZ plant is an excellent choice for tough indoor use - *Zamioculcas zamiifolia*

- survive most interior environments. *Greenhouse Management and Production* 27:50-56.
- 9- Lopez R.G., Blanchard M.G., and Runkle E.S. 2009. Propagation and production of *Zamioculcas zamiifolia*. *Acta Horticulturae* 813: 559-564.
- 10- Ni K. 2015. *Zamioculcas zamiifolia* plant tissue culture method. *Anhui Agricultural Science Bulletin* 10(6): 56-63.
- 11- Papafotiou M., and Martini A. 2009. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micro propagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ). *Scientia Horticulturae* 120: 115-120.
- 12- Pan X.F., Wang J.H., and Fu Q.M. 2007. Study on Rapid Vitro Propagation of *Zamioculcas Zamiifolia*. *Natural Science Journal of Hainan University* 23: 105-113.
- 13- Reid M.S., and Cevallos J.C. 2009. Postharvest biology and technology for new floricultural crops. *Acta Horticulture* 813: 209-216.
- 14- Seneviratne K.A.C.N., Daundasekera W.A.M., and Kulasooriya S.A. 2013. Development of rapid propagation methods and a miniature plant for export-oriented foliage, *Zamioculcas zamiifolia*. *Ceylon Journal of Science (Bio Sci)* 42(1): 55-62.
- 15- Shi H., and Liang P. 2003. Plantlet Regeneration from Leaf Explants of *Zamioculcas zamiifolia*. *Acta Horticulturae Sinica* 115: 131-139.
- 16- Vanize-canton S.D., and Leonhardt K.W. 2009. In vitro callus induction and plantlet regeneration protocol developed for the oryzalin treatment of *Zamioculcas zamiifolia*. *Acta Horticulturae* 813(26): 201-208.
- 17- Xue C.L., Guo J.M., Chen Y.J., and Quan S.Z. 2010. Study on Differentiation and Induction Callus and Embryoid from the Leaves of *Zamioculcas zamiifolia* Rehd. *Modern Agricultural Science and Technology* 45: 25-33.
- 18- Zhou J.H., Zhou Y., Liu X.M., Zhu Z.P., Deng B.G., and Luo N.S. 2005. In vitro Culture and Rapid Propagation of *Zamioculcas zamifolia*. *Acta Agriculturae Jiangxi* 89: 28-36



Optimization of Callus Production and Regeneration of *Zamiifolia* (*Zamioculcas zamiifolia*)

M. Sayadi Nejad¹- S.M. Sadeghi^{2*}

Received: 27-06-2018

Accepted: 10-07-2019

Introduction: *Zamiifolia* is a perennial ornamental plant and is one of the most important medicinal plants of the Araceae family. The origin of this evergreen, low-anticipated plant is East Africa. *Zamiifolia* spreads through the leaves and split rhizomes, which is very time-consuming. The traditional *Zamiifolia* proliferation method have been done by dividing rhizomes and leaf cuttings, but the production efficiency is low due to the slow growth of the plant, tubers and roots. In addition, due to the warm and humid environment, reproduction is limited to summer season. Due to the traditional reproductive problems in this plant, tissue culture or microbial culture is the best way to replicate rapidly and to achieve a large number of plants with the same genetic structure, as well as the elimination of diseases in the short term and reducing the costs. The aim of this study was to compare different microorganisms in terms of calogenesis and regeneration, as well as to determine the optimum culture medium for *Zamiifolia* tissue culture.

Materials and Methods: In this study, the explants prepared for the first experiment, including rhizome and petiole and the explants for the second experiment were the leaeaves and shoots. In the first experiment, rhizome and petiole were cultured in three replications in ½ MS medium containing BA (0, 2, 4 mg / L) and 2,4-D (0,1,2 mg / L) in combination with vitamins, 30 g/l sucrose, 5 g / L agar and adjusted to 5.8 PH. The cultivars were cultured for the callus induction under temperature of 27-25 ° C and light conditions of 16 hours light and 8 hours darkness. After 5 weeks, the percentage of callus and fresh callus weight were measured. The callus generated from rhizome and petiole in three replicates on ½ MS medium containing BA (0, 1, 2 mg / L) and 2,4-D (0, 0.5, 1 mg / l) for shoots and after the observation of branches and leaf buds were grafted on to ½ MS medium containing BA (0, 1, 2 mg / L) and NAA (0, 0.5, 1 mg / L) for rooting. Traits such as time to shoot elongation were recorded at regeneration stage, and after 5 weeks, shoot length and the number of leaves were measured. The time to rootstock was also recorded. In the second experiment leaf and shoot explants were cultured in ½ MS medium containing BA (0, 2, 4 mg / l) and NAA (0, 0.5, 1 mg / L) in combination with vitamins, 30 g/l sucrose, 5 g / L agar and PH adjusted to 5.8. The cultivars were cultured for the callus induction under temperature 27-25 °C and light conditions of 16 hours light and 8 hours darkness. The time to reach the callus was recorded and after 5 weeks, the percentage of callus and fresh callus weight were measured. The calli generated from the leaves and shoots were cultures on ½ MS medium containing BA (0, 1, 2 m g / L) and NAA (0, 0.5, 1 mg / L) for shoots and after observation of branch and leaves were transplanted to the ½ MS medium containing BA (0, 1, 2 mg / L) and NAA (0, 1, 2 mg /L) for rooting. The traits such as time to shoot elongation were recorded at the regeneration stage, After 5 weeks, the shoot length and the number of leaves were measured. The time to rootstock was also recorded.

Results and Discussion: The results of the first experiment showed that the effect of the rhizome and petiole type on the callus formation was significant at 1% level. So that the rhizome showed greater ability to callogenesis. The results of the second experiment showed that the effect of the type leaf and shoot on the callus formation was significant at 1% level. So that the leaf showed greater ability to callogenesis. The highest percentage of callosing (94.5%), the shortest time to reach the callus (14 days) and the highest callus weight (1.1 g) in culture medium with 2 mg / l BA and 1 mg / l hormones NAA was observed in leaf samples from the second experiment. The best treatment in the shoot elongation stage, which included the shortest time to shoot formation (10.5 days), the longest shoot length (4.10 cm), and the highest leaf number (8 leaves) in the leaf extract with hormonal concentrations of 2 mg / 0 mg / L NAA was observed from the second experiment. In the rooting stage, the best treatment for petiole extracts with hormonal concentrations was 1 mg / l BA and 0.5 mg / l NAA with 14 days to rooting from the first experiment.

Conclusion: In this study, explants and various concentrations of growth regulators had significant effect on the response to callus induction in *Zamiifolia*. In the first experiment, the rhizome and in the second experiment the leaf showed a better reaction to callus induction. According to this research, it can be suggested that the treatments applied in both experiments should be applied on all four leaves, petiole, rhizome and shoot samples, and the best culture type and the best culture medium for the cultivation of *Zamiifolia* plant tissue should be determined in subsequent studies.

Keywords: BA, Micro propagation, Sub culture, Tissue culture



تأثیر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر صفات مورفوفیزیولوژیک و عناصر برگ گیاه پرپوش تحت تنش خشکی

محترم عباسپور اسفدن^۱ - سپیده کلاته جاری^{۲*} - فواد فاتحی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۳۱

چکیده

پرپوش (*Catharanthus roseus*) گیاهی زیبا و رونده از خانواده خرزهره‌ئیان و دارای کاربردهای زینتی و دارویی است. این گیاه همانند سایر گونه‌های فضای سبز تحت تأثیر آثار سوء ناشی از تنش خشکی قرار می‌گیرد، اما در این راستا استفاده از محرک‌های رشد گیاهی می‌تواند برای گیاه تحت تنش مفید باشد. بنابراین تحقیق حاضر به منظور تأثیر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر صفات مورفو-فیزیولوژیکی گیاه پرپوش تحت تنش خشکی انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل شامل محلول‌پاشی در ۵ سطح (شاهد، ال-آرژنین ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار، اسید سالیسیلیک ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تنش خشکی در سه سطح (۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. صفات مورد بررسی شامل کارایی مصرف آب، نسبت وزن ریشه به شاخساره، تعداد گل، قطر گل، محتوای کلروفیل برگ، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز برگ و عناصر پرمصرف (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) برگ بود. کارایی مصرف آب در تیمارهای تحت تأثیر تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بیشتر از سایر تیمارها بدست آمد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش محلول‌پاشی و تنش خشکی بر نسبت وزن ریشه به شاخساره، فعالیت آنزیم پراکسیداز، مقدار فسفر و نیتروژن برگ معنی‌دار شد. نسبت وزن ریشه به شاخساره در تیمارهای عدم محلول‌پاشی (شاهد) $40 \times$ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۱/۵ میلی‌مولار $40 \times$ درصد ظرفیت زراعی بیشتر از سایر تیمارها گزارش شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار برهمکنش عدم محلول‌پاشی و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی کمتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود. بیشترین مقدار فسفر و نیتروژن در تمامی سطوح محلول‌پاشی در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. حداقل مقدار عناصر پرمصرف در تیمارهای حاوی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. قطر و تعداد گل در تیمارهای ۱۰۰ درصد و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بیشتر از ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد و در بین تیمارهای محلول‌پاشی میانگین قطر گل و کلروفیل کل در تیمار ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار بیشتر بود. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به‌ترتیب در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد و در بین تیمارهای محلول‌پاشی، فعالیت این آنزیم در تیمارهای ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار و اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشتر از سایر تیمارها بود. بنابراین با هدف مصرف بهینه آب و محلول‌پاشی، در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و استفاده از ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار یا اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش عناصر فسفر و ازت گردید. همچنین در مجموع تیمارهای ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار یا اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش تعداد و قطر گل پرپوش شدند.

واژه‌های کلیدی: عناصر پرمصرف، کارایی مصرف آب، کلروفیل کل، محرک‌های رشد

مقدمه

می‌باشد. خانواده Apocynaceae (خرزهره‌ئیان) به عنوان یکی از بزرگ‌ترین خانواده در نهان‌دانگان در نظر گرفته شده است که شامل ۳۷۵ جنس و بیش از ۵۱۰۰ گونه در سراسر جهان می‌باشد (۴۰). این خانواده اهمیت قابل توجهی در زمینه پزشکی به دلیل استفاده گسترده در شیمی درمانی سرطان، بیماری‌های پوستی، دیابت، اسهال و مالاریا دارد. گیاه پرپوش، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که بیش از ۹۰ ترکیب ایندول آلکالوئید دارد که مهم‌ترین آنها آجمالاسین و سرپنتین می‌باشند که در درمان بیماری فشار خون و

گیاه پروانش کبیر (پرپوش) با نام علمی *Catharanthus roseus* متعلق به خانواده Apocynaceae و راسته Gentianales

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد باغبانی و استادیار، گروه علوم باغبانی باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
(*) نویسنده مسئول: (Email: kalatejari@yahoo.com)

۳- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.73631

وین بلاستین و وین کریستین در شیمی درمانی بیماران سرطانی کاربرد دارند (۲۷ و ۳۶). پریش از جمله گیاهان زیبا و رونده است که برخی به خاطر زیبایی آن، گل‌ها را به صورت آویز پرورش می‌دهند. ساقه‌های آن می‌توانند ۶۰ الی ۹۰ سانتی‌متر رشد کنند. این گیاه مناسب حاشیه باغچه و یا آویزها است. گل‌های پریش عموماً به رنگ‌های صورتی، بنفش، سفید و قرمز لوله‌ای شکل به ارتفاع ۲/۵ سانتی‌متر هستند. برگ‌های این گیاه بیضی شکل به طول ۲/۵ تا ۹ و عرض ۱ تا ۳/۵ سانتی‌متر است. این برگ‌ها بدون کرک با دم‌برگ کوتاه به طول ۱ تا ۱/۸ سانتی‌متر است که در یک زوج متضاد قرار گرفته‌اند. دوره گل‌دهی این گیاه در تابستان است و از اواخر خرداد تا اولین سرماهای پاییزه امکان‌پذیر است. گل پریش مکان آفتابی و دارای خاک مرطوب را می‌پسندد. به خاک گلدانی لومی، آبیاری مرتب و کود مایع در هر ماه نیاز دارد و حداقل دمای قابل تحمل آن ۱۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۴۰).

خشکی یکی از تنش‌های محیطی بوده که روی اکثر مراحل رشد، ساختار و فعالیت‌های گیاهی آثار مخرب و زیان‌آوری وارد می‌سازد. پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطوح مورفولوژی، سلولی و مولکولی متفاوت است (۴۵). توانایی گیاهان برای سازش به تنش‌های محیطی به نوع، شدت تنش و همچنین گونه گیاهی و مرحله وقوع تنش بستگی دارد. گیاهان در شرایط تنش واکنش‌های متفاوتی به صورت اجتناب و یا تحمل در برابر تنش نشان می‌دهند (۲۵). کاهش عملکرد گیاهان تحت تنش خشکی از طریق سه مکانیسم کلی شامل کاهش جذب تشعشع فعال فتوسنتزی، کاهش کارایی مصرف نور و کاهش آبی در تبادل گاز کربنیک به ازای واحد نور جذب شده قابل بیان است (۲۰). مقاومت اکتسابی در گیاهان به دو شکل موضعی و همگانی مطرح می‌باشد. از این رو دو راهکار کلی در رابطه با عامل القاکننده مقاومت در گیاهان وجود دارد. یکی از مهم‌ترین راهکارها برای ایجاد مقاومت گیاهان در هنگام تنش‌های محیطی مانند خشکی، تولید اسید سالیسیلیک و اسید آمینه در پاسخ به تنش است (۲۶، ۳۵ و ۳۷).

اسید سالیسیلیک یک تنظیم‌کننده رشد درونی طبیعی می‌باشد و به گروهی از ترکیبات فنلی تعلق داشته و از نام *Salix* (بید) مشتق شده است. این اسید ماده‌ای شبه هورمونی است که بر رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد. اسید سالیسیلیک ماده‌ای طبیعی است که به طور معمول در عکس‌العمل گیاه در تنش‌های زیستی و فیزیکی به کار می‌رود. کاربرد اسید سالیسیلیک خارجی می‌تواند باعث افزایش اسید سالیسیلیک درون‌زا شود. اسید سالیسیلیک درون‌زا یک علامت القایی برای پاسخ‌های دفاعی ویژه گیاهان است (۲۶). همچنین نظام دفاع اکتسابی (SAR)^۱ گیاه موجب حفاظت طولانی مدت گیاه در برابر

طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا می‌شود. این نظام نیاز به مولکول‌های سیگنال دهنده‌ای نظیر اسید سالیسیلیک دارد و تحریک آن با پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی مرتبط است. مشخص شده است که در واکنش به اسید سالیسیلیک، پروتئینی خاص به سمت هسته حرکت کرده و سبب تحریک نظام SAR می‌شود. مقدار اسید سالیسیلیک بعد از آلوده شدن گیاه به عامل بیماری‌زا تا چند برابر افزایش می‌یابد که این افزایش مرتبط با SAR می‌باشد (۳). اسید سالیسیلیک در گیاهانی که تحت تنش‌های محیطی قرار دارند نقش حفاظتی دارد. کاربرد خارجی این هورمون باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، پروکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در شرایط تنش خشکی در گیاهان می‌شود (۳ و ۷).

اسید آمینه آرژنین یکی از اسیدآمینه‌های ضروری است که علاوه بر تبدیل سوخت‌وساز درونی با اسیدآمینه‌های پرولین و گلوتامات، به عنوان پیش ماده برای سنتز پروتئین، نیتریک اکسید، کراتین، پلی آمین‌ها، آگماتین و اوره نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴). ال-آرژنین شکل طبیعی رایج اسیدآمینه آرژنین است. کاربرد کودهای دارای اسیدهای آمینه مانند ال-آرژنین از مهم‌ترین راه‌های افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش خشکی می‌باشد (۱۴). تنش خشکی مانع از اثرگذاری آمینواسیدهای درون گیاه می‌شود و آمینواسیدهایی که به عنوان کود استفاده می‌شوند به عنوان نیروی مضاعف، همراه با آب آبیاری یا محلول پاشی به کمک گیاه می‌آید. همچنین در شرایط سخت تنش‌های محیطی، می‌توان نقش اسیدهای آمینه در مقاومت به تنش‌ها را در صرفه‌جویی در مصرف انرژی برای گیاه خلاصه کرد. بنابراین با کاربرد کودهای اسید آمینه‌دار می‌توان سبب افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش خشکی شد (۸ و ۲۳). راه کارهای مختلفی نظیر مدیریت زراعی و افزایش مقاومت به خشکی از طریق شیوه‌های نوین مانند کاربرد اسید سالیسیک و اسید آمینه آرژنین برای به حداکثر رساندن رشد گیاهان تحت شرایط تنش محیطی مانند خشکی به کار گرفته می‌شود. مطالعات مختلفی در زمینه تأثیر کودهای دارای اسیدهای آمینه و اسید سالیسیلیک به منظور تعدیل تنش انجام شده است. برای مثال مردانی و همکاران (۳۳) روی دانه‌های خیار و نقوم و همکاران (۳۸) روی ارزن مرواریدی نشان دادند که اسید سالیسیلیک سبب بهبود صفات فیزیولوژیکی و رشد گیاه شد. همچنین ویلز و لی (۴۹) روی گیاه کاهو نشان دادند که ال-آرژنین سبب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاه شد. اما تاکنون تحقیقی در زمینه تأثیر اسید سالیسیلیک و کودهای اسید آمینه‌دار روی گیاه پریش انجام نشده است. بنابراین تحقیق حاضر به منظور تأثیر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه پریش تحت تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و ۳ تکرار با دو عامل شامل محلول‌پاشی در پنج سطح (شاهد، ال-آرژنین ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار، اسید سالیسیلیک ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تنش خشکی در سه سطح (۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) با ۱۵ تیمار، در شرایط گلخانه‌ای با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت (روشنایی/تاریکی) و دمای ۱۷/۲۹ درجه سانتیگراد (روز/شب) در آزمایشگاه گروه زراعت دانشگاه تهران در کرج و در سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ انجام شد. برای انجام آزمایش، ابتدا نشاهای ۴ برگی از گیاه پرپوش رقم روزنا از مرکز گل و گیاهان زینتی محلات تهیه گردید و در گلدان‌هایی با قطر دهانه ۱۷، قطر کف ۹ و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر با ترکیب بستر کشت خاک باغچه (لوم)، سبوس برنج، پوکه معدنی و ماسه شسته با نسبت حجمی (۵:۱:۱) کشت شدند. گیاهان دو هفته بعد از استقرار با ال-آرژنین و اسید سالیسیلیک محلول‌پاشی شدند و در مجموع ۵ مرتبه با فواصل ۸ روزه محلول‌پاشی شدند. ۱۰ روز بعد از اولین محلول‌پاشی تیمارهای تنش خشکی اعمال شد و به مدت یک ماه ادامه داشت. اعمال تنش بر اساس ظرفیت زراعی خاک اعمال شد. تعیین ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی خاک با استفاده از دستگاه صفحات فشاری^۱ انجام شد. سپس طبق رابطه ۱ مقدار آب مورد نیاز برای هر گلدان مشخص شد (۲۱).

$$V_n = (FC - PWP) / 100 \times \rho_b \times V_p \times F \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن: V_n مقدار آب داده شده (بر حسب میلی‌متر) به هر گلدان در هر نوبت آبیاری است. FC رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی (درصد)، PWP نقطه پژمردگی دائم (درصد)، ρ_b جرم مخصوص ظاهری خاک (گرم بر سانتی‌متر مکعب)، V_p حجم گلدان (سانتی‌متر مکعب)، F ضریب مدیریت آبیاری که در آبیاری مطلوب برای پرپوش حدود ۰/۳ است. همچنین مقدار آن تنش متوسط و شدید به ترتیب ۰/۵ و ۰/۷ در نظر گرفته شد. این ضریب که تخلیه مجاز از نظر مدیریتی (MAD)^۲ است به صورت اعشار یا درصدی از آب قابل دسترس بیان می‌شود که بستگی به مدیریت آبیاری و نوع کشت دارد. در گیاهان حساس و گل‌های زینتی مقدار آن کم در نظر گرفته می‌شود (۰/۲ تا ۰/۳)، این بدان معناست که فاصله آبیاری در این گیاهان باید کم باشد (۱۷).

تنش در سه سطح: ۱- شاهد (آبیاری در حد ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۲- تیمار تنش ملایم (آبیاری در حد ۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و ۳- تنش شدید (آبیاری در حد ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) اعمال شد.

در نهایت وقتی گیاهان وارد مرحله زایشی شدند صفات نسبت

وزن ریشه به شاخساره، تعداد گل، قطر گل، محتوای کلروفیل کل برگ، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز برگ و عناصر پرمصرف (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) برگ اندازه‌گیری شد. قطر گل‌ها با استفاده از کولیس دیجیتال برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. همچنین تعداد کل گل‌ها در هر تکرار به صورت هفتگی شمارش و ثبت گردید.

کارایی مصرف آب (WUE)^۳ از نسبت عملکرد گیاه در گلدان نسبت به حجم آب مصرفی گیاه در طول دوره رشد بدست آمد (۲۷).

اندازه‌گیری میزان محتوای کلروفیل با روش آرنون (۴) انجام شد. مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه از برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته جدا و در هاون چینی ریخته و کوبیده شد. حجم نهایی عصاره با استون ۸۰ درصد به ۲ میلی‌لیتر رسید. سپس عصاره با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $5000 \times g$ صاف شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160) برای اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها استفاده شد. ابتدا دستگاه با استون ۸۰ درصد صفر شده و سپس میزان جذب عصاره استخراج شده در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر، ۶۶۳ نانومتر، ۴۸۰ نانومتر و ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160) قرائت شد. با استفاده از رابطه زیر کلروفیل کل محاسبه شد.

$$\text{کل در هر گرم برگ تر} = [(20.2 \times A_{645}) + (8.02 \times A_{663})] \times V / 1000 \times W$$

در رابطه بالا، A میزان جذب در طول موج مورد نظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد برحسب میلی‌لیتر و W اندازه برگ تازه برحسب گرم است.

تهیه عصاره آنزیمی: برگ‌ها با نیتروژن مایع کاملاً خرد شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار به آن اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با تکان‌های ملایم استخراج شد. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (EDISON, NJ U6 A Labnet international, Inc,) (RAYING, QUANTITY) و از محلول شفاف رویی برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز: اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز طبق روش گیانوپولیتیس و همکاران (۱۹) انجام شد. اساس اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم، اثر بازدارندگی این آنزیم با احیای نوری نیتروبلوترازولیوم (NBT) است. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های آزمایشی و یک میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های مربوطه ریخته و

1- Pressure plate

2- Management Allowed Depletion

3- Water Use Efficiency

مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه-ای دانکن بررسی شد.

نتایج و بحث

عملکرد گیاه، حجم آب مصرفی و کارایی مصرف آب: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی، محلول‌پاشی و برهمکنش آنها بر حجم آب مصرفی، کارایی مصرف آب و عملکرد گیاه معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$) (جدول ۱). بیشترین عملکرد گیاه (۱۱/۸ گرم در بوته) در تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار به‌دست آمد (جدول ۲). بیشترین حجم آب مصرفی (۴/۷ لیتر در بوته) مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار و کمترین مقدار آن (۱/۸ لیتر در بوته) مربوط به تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم محلول‌پاشی بود. کارایی مصرف آب در ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار با ۳/۴۵ گرم در لیتر بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲). کادافیجی و همکاران (۲۸) نشان دادند که آبیاری محدود با مدیریت مناسب سبب افزایش کارایی مصرف آب می‌شود. کومار و همکاران (۳۱) بیان کردند که آبیاری مازاد تاثیر معنی‌داری روی کارایی مصرف آب و عملکرد نداشت. در تحقیق حاضر کارایی مصرف آب در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار در لیتر، بیشتر از سایر تیمارها گزارش شد.

لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌های آزمایشی و کنترل به مدت ۱۰ دقیقه در روشنایی حاصل از نور مصنوعی در یک اتاقک قرار داده شدند. سپس در طول موج ۵۶۰ نانومتر با کمک اسپکتروفتومتر (مدل T80+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) جذب نمونه-ها قرائت شد. درصد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مساوی است با جذب نمونه منهای جذب شاهد تقسیم بر جذب شاهد ضرب در ۱۰۰. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش پول و همکاران (۴۲) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱۸ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در لوله آزمایش ریخته شد. جذب نمونه بر اساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده شد. از محلول واکنش بدون عصاره جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز مساوی است با جذب خوانده شده تقسیم بر ۲۶/۶. فسفر با روش اسپکتروفتومتری (۳۹)، پتاسیم با روش فلیم-فتومتری (۱۴) و نیتروژن با روش کج‌دال (۹) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند.

جدول ۱- تجزیه واریانس حجم آب مصرفی، کارایی مصرف آب و عملکرد گیاه پریش تحت تاثیر کاربرد ال-آرژنین و اسید سالیسیلیک در شرایط

تنش خشکی

Table 1- The analysis of variance for consumption water volume, water use efficiency, and plant yield of *Catharanthus roseus* under salicylic acid, L-arginine, and drought stress conditions.

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares		
		عملکرد گیاه Plant yield (g/plant)	حجم آب مصرفی Consumption water volume (l/plant)	کارایی مصرف آب Water use efficiency (g/l)
محلول‌پاشی Foliar application	4	192.9**	0.18**	3.88**
تنش خشکی Drought stress	2	4.98**	27.99**	0.32**
محلول‌پاشی × تنش خشکی Foliar application × Drought stress	8	0.50**	0.02**	0.20**
خطا Error	30	0.11	0.0009	0.001
ضریب تغییرات CV (%)		4.09	1.2	1.4

** نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۱ درصد است.

** representing the significance at 1% level.

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین عملکرد گیاه، حجم آب مصرفی و کارایی مصرف آب در طی دوره رشد گیاه پرپوش تحت تأثیر کاربرد ال-آرژنین و اسید سالیسیلیک تحت تنش خشکی

Table 2- Mean comparison results of plant yield, consumption water volume and water use efficiency during plant growth of *Catharanthus roseus* under salicylic acid, L-arginine, and drought stress conditions.

تنش خشکی Drought stress	محلول پاشی Foliar application	عملکرد گیاه Plant yield (g/plant)	حجم آب مصرفی Consumption water volume (l/plant)	کارایی مصرف آب Water use efficiency (g/l)
۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی 100% FC	شاهد Control	9.5 ^{de}	4.5 ^c	2.11 ^h
	اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم			
	در لیتر	11.5 ^{ab}	4.6 ^b	2.50 ^e
	Salicylic acid 100 mg/l			
	اسید سالیسیلیک ۲۰۰ میلی گرم			
	در لیتر	10.1 ^d	4.5 ^c	2.24 ^g
	Salicylic acid 200 mg/l			
	ال-آرژنین ۱/۵ میلی مولار			
	L- arginine 1.5 mM	9.7 ^{de}	4.51 ^c	2.15 ^h
	ال-آرژنین ۳ میلی مولار			
۷۰ درصد ظرفیت زراعی 70% FC	L- arginine 3 mM	11.8 ^a	4.8 ^a	2.51 ^e
	شاهد Control	9.2 ^{ed}	3.15 ^{de}	2.92 ^d
	اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم			
	در لیتر	10.7 ^c	3.18 ^{de}	3.36 ^b
	Salicylic acid 100 mg/l			
	اسید سالیسیلیک ۲۰۰ میلی گرم			
	در لیتر	9.5 ^{de}	3.16 ^{de}	3.01 ^c
	Salicylic acid 200 mg/l			
	ال-آرژنین ۱/۵ میلی مولار			
	L- arginine 1.5 mM	9.1 ^e	3.14 ^e	2.90 ^d
۴۰ درصد ظرفیت زراعی 40% FC	ال-آرژنین ۳ میلی مولار			
	L- arginine 3 mM	11 ^{bc}	3.19 ^{cde}	3.45 ^a
	شاهد Control	3.6 ^g	1.8 ^g	2.00 ⁱ
	اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم			
	در لیتر	4.2 ^{fg}	1.85 ^{fg}	2.27 ^g
	Salicylic acid 100 mg/l			
	اسید سالیسیلیک ۲۰۰ میلی گرم			
	در لیتر	4.1 ^{fg}	1.82 ^g	2.25 ^g
	Salicylic acid 200 mg/l			
	ال-آرژنین ۱/۵ میلی مولار			
	L- arginine 1.5 mM	3.8 ^{fg}	1.8 ^g	2.11 ^h
	ال-آرژنین ۳ میلی مولار			
	L- arginine 3 mM	4.4 ^f	1.88 ^f	2.34 ^f

حروف لاتین مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار میانگین ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می باشد.
Same latters show no significant difference of data means in Duncan test at 5% level.

(۲۹) نشان دادند که حجم آب مصرفی، عملکرد گیاه در بوته و کارایی مصرف آب با افزایش شدت تنش کاهش می یابد. نسبت وزن ریشه به شاخساره: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش محلول پاشی × تنش خشکی بر نسبت وزن ریشه به شاخساره معنی دار شد ($p \leq 0.05$) (جدول ۳). نسبت وزن ریشه در تیمارهای عدم محلول پاشی (شاهد) × ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۱/۵ و ۳ میلی مولار × ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بیشتر از سایر

البته تغییر اصلی در مقدار کارایی مصرف آب مربوط به تنش می باشد. یعنی می توان با تغییر مقدار آب مصرفی از ۱۰۰ به ۷۰ درصد ظرفیت زراعی ضمن کاهش حجم آب مصرفی، کارایی بیشتری نیز بدست بیاوریم. در مطالعه حاضر عملکرد گیاه و حجم آب مصرفی با افزایش تنش کاهش یافت، اما روند کارایی مصرف آب از ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به ۷۰ درصد، افزایشی و از ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، کاهشی بود (جدول ۲). کریمی و همکاران

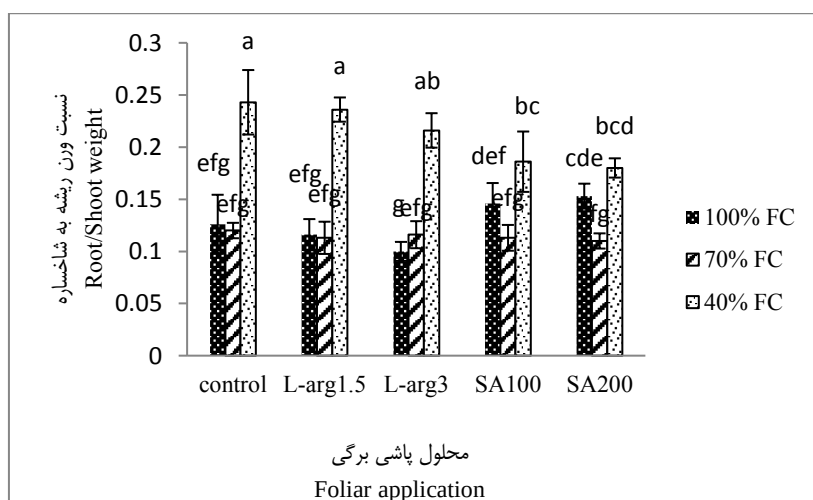
تیمارها گزارش شد (شکل ۱). این نشان می‌دهد که نسبت کاهش وزن شاخساره به ریشه در تمام سطوح محلول‌پاشی تحت تنش خشکی بیشتر است و همچنین در شرایط تنش، گیاه جهت استفاده بهینه از آب، ریشه‌دوانی را افزایش می‌دهد. نسبت وزن خشک ریشه به شاخساره به‌طور معمول تحت شرایط استرس خشکی افزایش می‌یابد (۱۰ و ۳۴) که احتمالاً در نتیجه کاهش بیشتر رشد شاخساره نسبت به رشد ریشه بوده است. رشد شاخساره به‌طور معمول بیشتر از رشد ریشه نسبت به استرس خشکی حساس است. ریشه‌ها به دلیل تعدیل اسمزی توانایی بیشتری در حفظ فشار تورژسانس نسبت به برگ‌ها دارند. تفاوت در حساسیت بین شاخساره و ریشه در شرایط

تنش خشکی احتمالاً در ارتباط با اثرات آبسیزیک اسید است که موجب جلوگیری از رشد شاخساره شده در حالی که رشد ریشه را حفظ می‌کند (۲۴). همچنین در طول استرس خشکی، تخصیص کربن به ریشه‌ها نسبت به شاخساره افزایش یافته و به ادامه حیات ریشه در خشکی کمک می‌کند (۲۴). افزایش نسبت وزن ریشه به شاخساره توسط توسکانو و همکاران (۴۷) روی گیاهان برگ بو (*Laurus nobilis* L. و شیشه‌شور (*Callistemon citrinus*) گزارش شد. همچنین الوارز و همکاران (۱) افزایش نسبت وزن ریشه به شاخساره را تحت تنش خشکی روی گونه‌های مختلف جنس شیشه‌شور گزارش کردند که با تحقیق حاضر همسوست.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی گیاه پریش تحت تأثیر کاربرد ال-آرژنین و اسید سالیسیلیک تحت تنش خشکی

Table 3- The analysis of variance for studied properties of *Catharanthus roseus* under salicylic acid, L-arginine, and drought stress conditions

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات								
		نسبت وزن ریشه به شاخساره Root/Shoot	تعداد گل Flower number	قطر گل Flower diameter	کلروفیل کل Total chl.	پروکسیداز Peroxidase	سوپراکسید دیسموتاز SOD	فسفر P	پتاسیم K	نیترژن N
محلول‌پاشی Foliar application	4	0.0005 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.42 ^{**}	0.12 ^{**}	0.01 ^{**}	0.009 ^{**}	3×10^{-5} ^{**}	0.43 ^{**}	2.03 ^{**}
خشکی Drought stress	2	0.04 ^{**}	2.42 ^{**}	8.6 ^{**}	0.92 ^{**}	1.5 ^{**}	2.48 ^{**}	1×10^{-4} ^{**}	5.4 ^{**}	16 ^{**}
محلول‌پاشی* خشکی Foliar application* Drought stress	8	0.001 [*]	0.33 ^{ns}	0.37 ^{**}	0.01 ^{ns}	0.006 ^{**}	0.0008 ^{ns}	8×10^{-6} [*]	0.02 ^{ns}	0.24 ^{**}
خطا Error	28	0.0004	0.35	0.05	0.007	0.0004	0.0005	3×10^{-6}	0.02	0.03
ضریب تغییرات CV .		14	58	8.3	8.9	3.6	2.84	19	7.1	5.8



شکل ۱- اثر متقابل محلول‌پاشی × تنش خشکی بر نسبت وزن ریشه به شاخساره گیاه پریش

Figure 1- The interaction effect of foliar application × drought stress on root/shoot weight of *Catharanthus roseus*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

محتوای کلروفیلی در سیب تحت تأثیر کاربرد ال-آرژنین توسط سوتیروپولوس و همکاران (۴۶) گزارش شد.

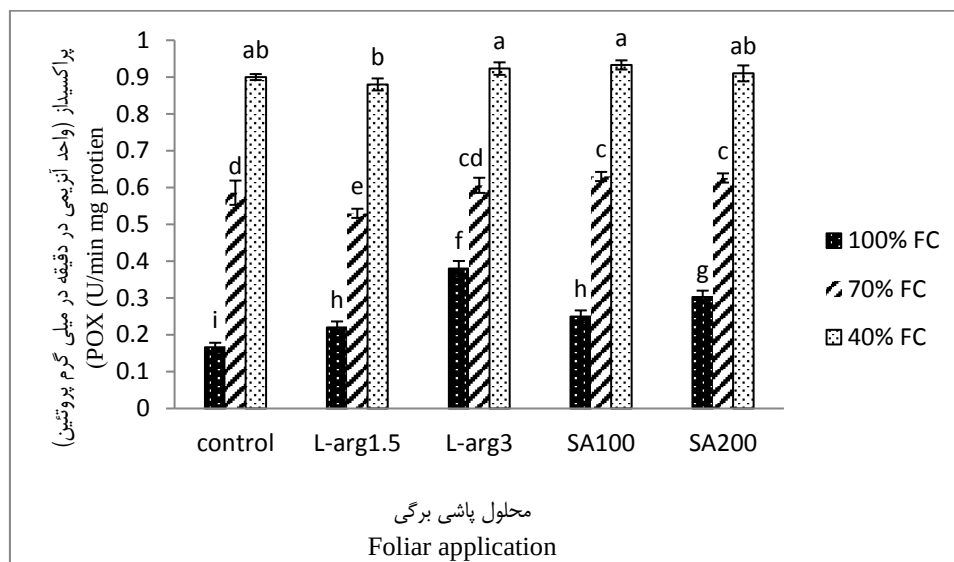
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: پراکسیداز تحت تأثیر اثر متقابل محلول پاشی و خشکی قرار گرفت (جدول ۳)، به طوری که تیمار عدم محلول‌پاشی × ظرفیت زراعی ۱۰۰ درصد دارای کمترین مقدار فعالیت نسبت به سایر تیمارها بود (شکل ۲). ال-آرژنین و اسید سالیسیلیک سبب افزایش پروتئین در گیاه می‌شود و چون آنزیم‌ها نیز پروتئین هستند بنابراین مقدار آنها در شرایط بدون تنش تحت تأثیر محرک‌های رشد افزایش یافته است. محلول‌پاشی در بیشتر موارد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌ها شد. محلول‌پاشی سبب افزایش پتانسیل آنتی-اکسیدانی گیاه شد که چنین روندی سبب افزایش قدرت گیاه در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد می‌شود. پراکسیدازها و ایزوزایم‌های آن برای آبیگری از سوبستراهای مختلف، ماده سمی آب‌اکسیژنه را مصرف می‌نمایند. آنزیم پراکسیداز از طریق اکسیداسیون سوبستراهای دهنده هیدروژن نظیر مواد فنولیکی سیرینگالدازین، گایاکول، پیروگالول و آسکوربات، پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند (۱۲). سوپراکسید هیدروژن نیز از طریق فعالیت آنزیم پراکسیداز به آب و اکسیژن خنثی می‌شود و یا اینکه به رادیکال خطرناک‌تر هیدروکسیل بدل می‌شود (۴۸). بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROSها قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوسول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند (۷). بسیاری از محققین ظهور یا عدم ظهور ایزوفرم‌ها در طی فرآیند یا جایگاه خاص را گزارش نموده‌اند (۷). بررسی ایزوآنزیمی پراکسیداز می‌تواند بررسی اثر تنش بر ترکیبات مختلف سلولی را نمایان می‌سازد (۴۸). انوشه و همکاران (۲) نشان دادند که محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک تغییری در فعالیت آنزیم SOD نداشت اما سبب افزایش فعالیت پراکسیداز شد. همچنین تنش خشکی سبب افزایش فعالیت هر دو آنزیم شد. آنها بیان کردند که تغییر در فعالیت آنزیم‌ها بسته به نوع تنش و نوع ماده محلول‌پاشی می‌تواند متفاوت باشد به طوری که می‌تواند سبب افزایش یک آنزیم و سبب کاهش آنزیمی دیگر شود.

نتایج نشان داد که فقط اثرات اصلی تنش خشکی و محلول‌پاشی بر فعالیت آنزیم SOD معنی‌دار شد. تیمارهای ۱۰۰ میلی گرم در لیتر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین ۳ میلی مولار دارای بیشترین فعالیت SOD (جدول ۴) و همچنین تنش خشکی شدید دارای بیشترین میانگین این آنزیم بود (جدول ۵). تنش خشکی سبب افزایش ROS در گیاه شده و سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین خط دفاعی سیستم آنتی‌اکسیدانی در مقابل ROS فعال می‌شود و باعث تبدیل رادیکال O_2^0 به H_2O_2 می‌شود، در ادامه H_2O_2 ایجاد شده به مولکول آب و اکسیژن تجزیه می‌شود که این عمل توسط آنزیم کاتالاز انجام می‌شود (۲۷). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که در

تعداد و قطر گل: تعداد گل فقط تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت ($P \leq 0.01$) (جدول ۳). قطر گل نیز فقط تحت تأثیر اثرات اصلی محلول‌پاشی و خشکی قرار گرفت (جدول ۳). بیشترین قطر گل (۳/۱ سانتی متر) در ال-آرژنین ۳ میلی مولار به دست آمد (جدول ۴). تعداد و قطر گل در تیمارهای ۱۰۰ درصد و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی بیشتر بود (جدول ۵). قطر و تعداد گل، با توجه به غلظت و نوع ماده محلول‌پاشی و همچنین گونه گیاهی، می‌تواند متغیر باشد. کاهش عملکرد گل تحت تنش خشکی توسط اسرار و همکاران (۶) گزارش شد. قاضی مناس و همکاران (۱۸) افزایش تعداد گل و ثابت ماندن قطر گل در گیاه بابونه آلمانی تحت تأثیر کودهای نیتروژن و ورمی کمپوست را گزارش کردند و بیان داشتند که کوددهی سبب افزایش تعداد گل می‌شود. در تحقیق حاضر، ال-آرژنین به عنوان یک اسید آمینه و دخالت در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه سبب افزایش قطر گل پرپوش شد. چون کارایی مصرف آب در تیمار ۷۰ درصد زراعی بیشتر و همچنین قطر و تعداد گل تغییر معنی‌داری نسبت به تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نداشتند، بنابراین با توجه به این صفات، تیمار ۷۰ درصد زراعی برتر است.

محتوای کلروفیل: اثرات اصلی محلول‌پاشی و تنش خشکی بر کلروفیل کل معنی‌دار شد ($P \leq 0.01$) (جدول ۳). کلروفیل کل در تیمار ال-آرژنین ۳ میلی مولار (۱/۱۴ میلی گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۴). همچنین تنش خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی سبب کاهش ۴۰ درصدی کلروفیل کل نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) شد (جدول ۵). تنش خشکی به عنوان یک عامل ایجاد کننده اختلال در فیزیولوژی گیاه روی عوامل فتوسنتزی گیاه تأثیر می‌گذارد. کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش خشکی ارتباط مستقیمی با ژنوتیپ و نوع گیاه دارد (۵). در شرایط تنش خشکی دستگاه فتوسنتزی تحت تأثیر قرار گرفته و فعالیت فتوسنتز II در گیاه کاهش می‌یابد (۵). بنابراین کاهش مقدار کلروفیل مشاهده شده در تحقیق حاضر در تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی احتمالاً به دلیل تأثیر تنش بر پیش‌سازهای سنتز کلروفیل یا تخریب کلروفیل موجود می‌باشد. در این راستا کاهش محتوای فتوسنتزی در گیاهان مختلف گزارش شده است (۳۱ و ۴۴). آرژنین دارای بیشترین مقدار نسبت کربن به نیتروژن است که چنین ویژگی سبب متمایز شدن این اسید آمینه به عنوان منبعی از نیتروژن آلی شده است. امینواسید اورنیتین نقش ساختاری در چرخه اوره و بیوسنتز آرژنین دارد. ال-آرژنین از اسید آمینه‌های بنیادی در فرایند تشکیل کلروفیل و افزایش مقدار بافت سبز در گیاهان است. این اسید آمینه باعث افزایش سنتز کلروفیل و بالا رفتن غلظت آن در گیاه شده که افزایش جذب نور و به دنبال آن افزایش فتوسنتز را در پی دارد. نتایج مشابهی در افزایش

چرخه آنتی اکسیدانی فعال می شود که در شرایط تنش افزایش می یابد (۱۱). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی در گیاهان مختلف گزارش شده است (۲۷، ۴۱ و ۴۳).



شکل ۲- اثر متقابل محلول پاشی × تنش خشکی بر فعالیت پراکسیداز گیاه پرپوش

Figure 2- The interaction effect of foliar application × drought stress on peroxidase activity of *Catharanthus roseus*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

دادند که کاربرد اسید سالیسیلیک تأثیری بر عناصر برگ گیاه کدو تحت تنش خشکی نداشت. اما گونس و همکاران (۲۱) گزارش نمودند که اسید سالیسیلیک باعث کاهش غلظت سدیم و کلر و افزایش فسفر و پتاسیم برگ شد که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد. همچنین اسید سالیسیلیک در گیاه جو سبب افزایش عناصر پرمصرف و کاهش سدیم شد (۱۵) و بالاخره الارسن و همکاران (۱۶) بیان نمودند که تأثیر اسید سالیسیلیک بر جذب و انتقال عناصر در گیاهان به پاسخی خاص برای هرگونه منجر می شود. حسین و همکاران (۲۵) افزایش پتاسیم و کاهش نیتروژن را تحت تأثیر تیمارهای اسید آمینه گزارش کردند. برخی از اثرات آرژنین مشابه ترکیبات حاصل از متابولیسم آن است. به طور مثال نیتریک اسید (NO) یکی از ترکیبات حاصل از متابولیسم آرژنین می باشد. گزارش شده است که NO در گیاه *Populus euphratica* از طریق افزایش نسبت پتاسیم به سدیم سبب افزایش مقاومت گیاه به شوری شده است. بنابراین آرژنین نقش مهمی در افزایش پتاسیم برگ و ریشه دارد (۵۰) که چنین روندی نیز در پژوهش حاضر مشاهده شد.

عناصر پرمصرف: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش محلول پاشی و تنش خشکی روی میانگین عناصر فسفر و نیتروژن برگ معنی دار و روی پتاسیم معنی دار نشد ($P \leq 0.05$) (جدول ۳). بیشترین مقدار فسفر در تمامی سطوح تیمارهای محلول پاشی، در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (شکل ۳). همچنین بیشترین مقدار نیتروژن در سطوح محلول پاشی ۱/۵ و ۳ میلی مولار ال-آرژنین و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید سالیسیلیک در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و ۳ میلی مولار ال-آرژنین در ۷۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد (شکل ۴). محلول پاشی سبب افزایش مقدار پتاسیم برگ شد و مقدار آن در اسید سالیسیلیک ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۴). اما تنش سبب کاهش پتاسیم شد به طوری که بیشترین و کمترین مقدار آن به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ درصد و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (جدول ۵). حداقل مقدار عناصر پرمصرف در تیمارهای حاوی ۴۰٪ ظرفیت زراعی مشاهده شد. مقدار عناصر پرمصرف تحت تنش بسته به نوع گیاه و نوع تنش متفاوت می باشد. در پژوهش های مختلف گزارشات متناقضی در مورد تأثیر اسید سالیسیلیک بر جذب یون ها وجود دارد. کوکماز و همکاران (۳۰) نشان

جدول ۴- اثر محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک و عناصر برگ گیاه پریوش
Table 4- The effect of salicylic acid and L-arginine on morpho-physiological properties and leaf nutrients of *Caltharanthus roseus*.

محلول‌پاشی Foliar application	نسبت وزن ریشه به شاخساره Root/Shoot weight	تعداد گل Flower number	قطر گل Flower diameter (cm)	کلروفیل کل Total chl. (mg/g)	پراکسیداز Peroxidase (U/ min mg protein)	دیسموتاز SOD (U/ min mg protein)	فسفر P (%)	پتاسیم K (%)	نیتروژن N (%)
شاهد Control	0.163 ^a	0.88 ^a	2.15 ^b	0.9 ^{cd}	0.55 ^c	0.77 ^c	0.007 ^c	1.9 ^c	1.93 ^c
ال-آرژنین ۱/۵ میلی‌مولار L- arginine 1.5 mM	0.155 ^a	0.88 ^a	2.6 ^b	0.85 ^d	0.55 ^c	0.76 ^c	0.008 ^{bc}	2 ^c	2.04 ^c
ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار L- arginine 3 mM	0.144 ^a	1.1 ^a	3.1 ^a	1.14 ^a	0.63 ^a	0.83 ^a	0.01 ^a	2.2 ^b	2.2 ^b
اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر Salicylic acid 100 mg/l	0.148 ^a	1.2 ^a	2.8 ^b	1.01 ^b	0.6 ^b	0.84 ^a	0.009 ^b	2.3 ^{ab}	2.3 ^{ab}
اسید سالیسیلیک ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر Salicylic acid 200 mg/l	0.147 ^a	1 ^a	2.7 ^b	0.94 ^{bc}	0.61 ^b	0.8 ^b	0.009 ^b	2.5 ^a	2.4 ^a

حروف لاتین مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.
Same letters show no significant difference of data means in Duncan test at 5% level.

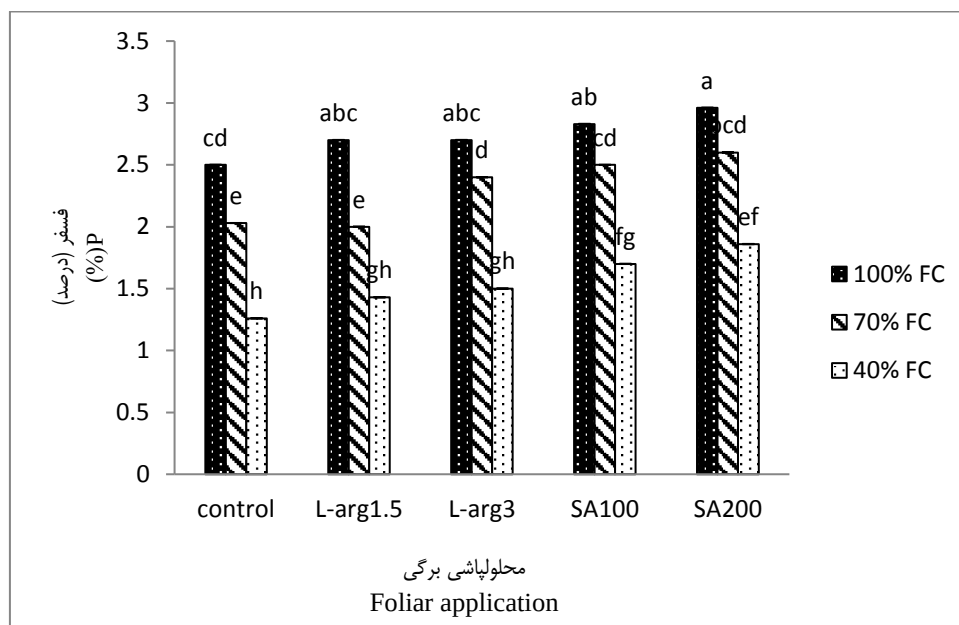
جدول ۵- اثر تنش خشکی بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و عناصر برگ گیاه پریوش

Table 5- The effect of drought stress on morpho-physiological properties of *Catharanthus roseus*

تنش خشکی Drought stress	نسبت وزن ریشه به شاخساره Root/Shoot	تعداد گل Flower number	قطر گل (سانتی متر) Flower diameter	کلروفیل کل (میلی گرم در گرم) Total chl. (mg/g)	پراکسیداز (واحد آنزیمی در دقیقه در میلی گرم پروتئین) (U/ min mg protein)	سوپراکسید دیسموتاز (واحد آنزیمی در دقیقه در میلی گرم پروتئین) SOD (U/ min mg protein)	فسفر (%) P (%)	پتاسیم (%) K (%)	نیترژن (درصد) N (%)
۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی 100% FC	0.12 ^b	1.06 ^a	3.1 ^a	1.2 ^a	0.26 ^c	0.47 ^c	0.01 ^a	2.7 ^a	4.2 ^a
۷۰ درصد ظرفیت زراعی 100% FC	0.11 ^b	1.4 ^a	3.2 ^a	0.97 ^b	0.59 ^b	0.67 ^b	0.008 ^b	2.3 ^b	3.6 ^b
۴۰ درصد ظرفیت زراعی 100% FC	0.21 ^a	0.6 ^b	1.9 ^b	0.72 ^c	0.90 ^a	1.2 ^a	0.007 ^c	1.5 ^c	2.2 ^c

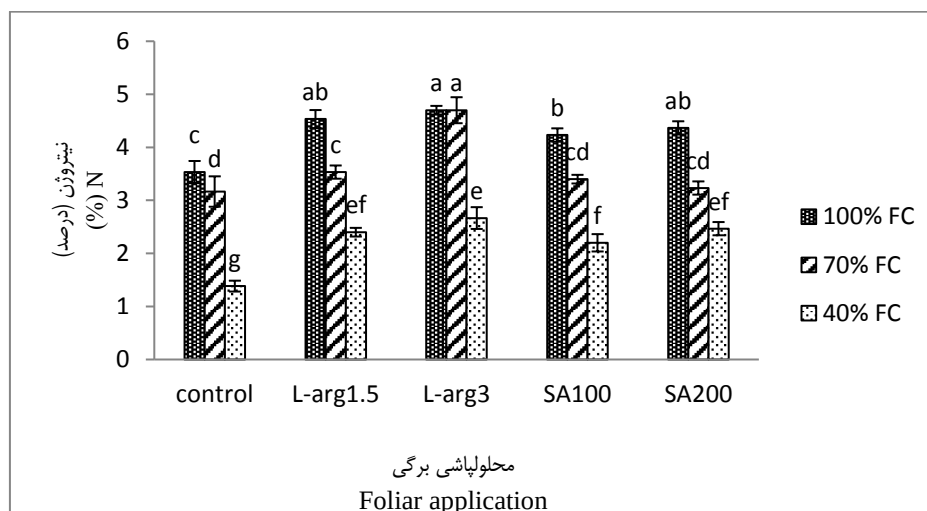
حروف لاتین مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Same letters show no significant difference of data means in Duncan test at 5% level.



شکل ۳- اثر متقابل محلول پاشی × تنش خشکی بر مقدار فسفر برگ گیاه پرپوش

Figure 3- The interaction effect of foliar application × drought stress on leaf phosphorus of *Catharanthus roseus*. (DMRT, $p \leq 0.05$)



شکل ۴- اثر متقابل محلول پاشی × تنش خشکی بر نیتروژن برگ گیاه پرپوش

Figure 4- The interaction effect of foliar application × drought stress on leaf nitrogen of *Catharanthus roseus*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

نتیجه گیری

گل را بدون تغییر نسبت به تیمار شاهد حفظ کرد. اما تیمار تنش شدید سبب کاهش عملکرد کلی گیاه می شود و می توان تا حدودی با تیمارهای محلول پاشی (ال-آرژنین ۳ میلی مولار و اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) آن را تعدیل نمود. بنابراین تحقیق حاضر با هدف مصرف بهینه آب و محلول پاشی، در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و استفاده از ال-آرژنین ۳ میلی مولار یا اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر موجب افزایش عناصر فسفر و ازت گردید. همچنین

در تحقیق حاضر تأثیر اسید سالیسیلیک و ال-آرژنین بر صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه پرپوش تحت تنش خشکی بررسی شد. نتایج کلی تحقیق نشان داد که کارایی مصرف آب در تیمارهای تحت تأثیر تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بیشتر از سایر تیمارها بود. همچنین می توان با کاهش مصرف آب تا ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تعداد و قطر

در مجموع تیمارهای ال-آرژنین ۳ میلی-مولار یا اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر موجب افزایش تعداد و قطر گل پیروش شدند.

منابع

- 1- Álvarez S., and Sánchez-Blanco M.J. 2015. Comparison of individual and combined effects of salinity and deficit irrigation on physiological, nutritional and ornamental aspects of tolerance in *Callistemon laevis* plants. *Journal of Plant Physiology* 185: 65-74.
- 2- Anosheh H.P., Emam Y., Ashraf M., and Foolad M.R. 2012. Exogenous application of salicylic acid and chlormequat chloride alleviates negative effects of drought stress in wheat. *Advanced Studies in Biology* 4(11): 501-520.
- 3- Arif T. 2015. Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 8: 455.
- 4- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1.
- 5- Ashraf M.H.P.J.C., and Harris P.J.C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51(2): 163-190.
- 6- Asrar A.A., Abdel-Fattah G.M., and Elhindi K.M. 2012. Improving growth, flower yield, and water relations of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) plants grown under well-watered and water-stress conditions using arbuscular mycorrhizal fungi. *Photosynthetica* 50(2): 305-316.
- 7- Bailey-Serres J., and Mittler R. 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* 141: 311.
- 8- Basha D.M.R.A., and El-Aila H.I. 2015. Response of foliar spraying with amino acids and integrated use of nitrogen fertilizer on Radish (*Raphanus sativus* L.) plant. *International Journal of ChemTech Research* 8(11): 135-140.
- 9- Bremner J.M., and Mulvaney C.S. 1982. Nitrogen—Total. p. 595-624. In A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Eds.) *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison. .
- 10- Carrow R.N. 1996. Drought resistance aspects of turfgrasses in the southeast: Root-shoot responses. *Crop Science* 36(3): 687-694.
- 11- Chakraborty U., and Pradhan D. 2011. High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. *Journal of Plant Interactions* 6(1): 43-52.
- 12- Chandra A., and Dubey A. 2010. Effect of ploidy levels on the activities of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, superoxide dismutase and peroxidase in *Cenchrus* species grown under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(1): 27-34.
- 13- Chapman H.D., and Pratt P.F. 1962. Methods of analysis for soils, plants and waters. *Soil Science* 93(1): 68.
- 14- Dinkeloo K., Boyd S., and Pilot G. 2018. Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. *Seminars in cell & developmental biology* 74:105-113.
- 15- El-Tayeb M.A. 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation* 45(3): 215-224.
- 16- Eraslan F., Inal A., Pilbeam D.J., and Gunes A. 2008. Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation* 55(3): 207.
- 17- Fazel F., Gheysari M., Mohammadian M., and Etemadi. 2015. Effect of Maximum Allowable Depletion on Irrigation Use and Plant Parameters of Grass under Subsurface Drip Irrigation Management. *Sciences and engineering of Irrigation* 1(40): 155-165.
- 18- Gazimonas M., Banchshafiee B., Hajsaidhadi M.R., and Darzi M.T. 2013. The effects of vermicompost and nitrogen on quantity and quality of *Matricaria chamomilla*. *Medicinal and Aromatic Plant Research* 29(2): 269-280.
- 19- Giannopolitis C.N., and Ries S.K. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59(2): 309-314.
- 20- Gu J., Yin X., Stomph T.J., Wang H., and Struik P.C. 2012. Physiological basis of genetic variation in leaf photosynthesis among rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines under drought and well-watered conditions. *Journal of Experimental Botany* 63(14): 5137-5153.
- 21- Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E. G., and Cicek N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164(6): 728-736.
- 22- Hatamzadeh A., Molaahmad Nalouei A., Ghasemnezhad M., and Biglouei M.H. 2015. The potential of nitric oxide for reducing oxidative damage induced by drought stress in two turfgrass species, creeping bentgrass and tall

- fescue. Grass and Forage Science 70(3): 538-548.
- 23- Hildebrandt T.M., Nesi A.N., Araújo W.L., and Braun H.P. 2015. Amino acid catabolism in plants. Molecular Plant 8(11): 1563-1579.
- 24- Hsiao T.C., and Xu L.K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to drought stress: biophysical analysis and relation to water transport. Journal of Experimental Botany 51: 1595-1616.
- 25- Hussain K., Nawaz K., Majeed A., Khan F., Lin F., Ghani A., Raza G., Afghan S., Zia-ul-Hussnain S., and Ali K. 2010. Alleviation of salinity effects by exogenous applications of salicylic acid in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) seedlings. African Journal of Biotechnology 9: 8602-8607.
- 26- Hussain M., Malik M.A., Farooq M., Ashraf M.Y., and Cheema M.A. 2008. Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. Journal of Agronomy and Crop Science 194(3): 193-199.
- 27- Jaleel C.A., Gopi R., Manivannan P., Gomathinayagam M., Murali P.V., and Panneerselvam R. 2008. Soil applied propiconazole alleviates the impact of salinity on *Catharanthus roseus* by improving antioxidant status. Pesticide Biochemistry and Physiology 90(2): 135-139.
- 28- Kadayifci A., Tuylu G.İ., Ucar Y., and Cakmak B. 2005. Crop water use of onion (*Allium cepa* L.) in Turkey. Agricultural Water Management 72(1): 59-68.
- 29- Karimi N., Sadraddini S.A.A., Nazemi A., Farsadizadeh D., Hossienzadeh Dalir A., and Dehghani F. 2009. Effects of deficit irrigation on yield and growth of greenhouse cucumber. Soil and Sciences Journal 20(1): 15-25. (In Persian)
- 30- Korkmaz A., Uzunlu M., and Demirkiran A.R. 2007. Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. Acta Physiologiae Plantarum 29(6): 503-508.
- 31- Kumar S., Imtiyaz M., Kumar A., and Singh R. 2007. Response of onion (*Allium cepa* L.) to different levels of irrigation water. Agricultural Water Management 89(1-2): 161-166.
- 32- Lotfi R., Pessarakli M., Gharavi-Kouchebagh P and Khoshvaghti H. 2015. Physiological responses of *Brassica napus* to fulvic acid under drought stress: Chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity. The Crop Journal 3(5): 434-439.
- 33- Mardani H., Baiat H., and Azizi M. 2011. The foliar application of salysilic acid on morphological and physiological properties of *Catharanthus roseus* L. under drought stress. Horticulture Journal 25(3): 320-336. (In Persian)
- 34- Merewitz E.B., Gianfagna T., and Huang B. 2010. Effects of SAG12-ipt and HSP18. 2-ipt expression on cytokinin production, root growth, and leaf senescence in creeping bentgrass exposed to drought stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 135(3): 230-239.
- 35- Miura K., and Tada Y. 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. Frontiers in Plant Science 5: 4.
- 36- Nayak B.S., and Pereira L.M.P. 2006. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. BMC Complementary and Alternative Medicine 6(1): 41.
- 37- Németh M., Janda T., Horváth E., Páldi E., and Szalai G. 2002. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. Plant Science 162(4): 569-574.
- 38- Ngom B., Mamati E., Goudiaby M.F., Kimatu J., Sarr I., Diouf D., and Kane N.A. 2018. Methylation analysis revealed salicylic acid affects pearl millet defense through external cytosine DNA demethylation. Journal of Plant Interactions 13(1): 288-293.
- 39- Olsen S.R., Sommers L.E., and Page A.L. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties of Phosphorus. ASA Monograph 9: 403-430.
- 40- Omidbeigi R. 2007. Production and processing of medicinal plants. 2nd ed.. Astane Ghodse Razavi, Mashhad, P347. (In Persian)
- 41- Pan Y., Wu L.J., and Yu Z.L. 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). Plant Growth Regulation 49(2-3): 157-165.
- 42- Polle A. 1997. Eiblmeier M., Sheppard L, Murray M. Responses of antioxidative enzymes to elevated CO₂ in leaves of Beech (*Fagus Sylvatica* L.) seedlings grown under a range of nutrient regimes. Plant Cell Environ, 20: 1317-21.
- 43- Porcel R., and Ruiz-Lozano J.M. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. Journal of Experimental Botany 55(403): 1743-1750.
- 44- Rahimi A., Jahanbin S., Salehi A., and Farajee H. 2016. Changes in content of chlorophyll, carotenoids, phosphorus and relative water content of medicinal plant of Borage (*Borago officinalis* L.) under the influence of mycorrhizal fungi and drought stress. Journal of Biological Sciences 17: 28-34.
- 45- Revilla P., Fernández V., Álvarez-Iglesias L., Medina E. T., and Caverio J. 2016. Leaf physico-chemical and physiological properties of maize (*Zea mays* L.) populations from different origins. Plant Physiology and Biochemistry 107: 319-325.

- 46- Sotiropoulos T.E., Dimassi K.N., and Therios I.N. 2005. Effects of L-arginine and L-cysteine on growth, and chlorophyll and mineral contents of shoots of the apple rootstock EM 26 cultured in vitro. *Biologia Plantarum* 49(3): 443-445.
- 47- Toscano S., Scuderi D., Giuffrida F., and Romano D. 2014. Responses of Mediterranean ornamental shrubs to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae* 178: 145-153.
- 48- Wang W.B., Kim Y.H., Lee H.S., Kim K.Y., Deng X.P., and Kwak S.S. 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(7): 570-577.
- 49- Wills R., and Li Y. 2016. Use of arginine to inhibit browning on fresh cut apple and lettuce. *Postharvest Biology and Technology* 113: 66-68.
- 50- Zhang A., Jiang M., Zhang J., Ding H., Xu S., Hu X., and Tan M. 2007. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist* 175(1): 36-50.



The Effect of Salicylic Acid and L-arginine on Morpho-physiological Properties and Leaf Nutrients of *Catharanthus roseus* under Drought Stress

M. Abaspour Esfaden¹- S. Kallaterjari^{2*} - F. Fatehi³

Received: 27-06-2018

Accepted: 22-07-2019

Introduction: *Catharanthus roseus* is a beautiful herbaceous plant, belonging to Apocynaceae family, which is widely cultivated due to its unique and beautiful appearance. It is native to the Caribbean Basin and has historically been used to treat a wide assortment of diseases. European herbalists used this plant for different conditions such as headache and a folk remedy for diabetes. The effects of drought range from morphological to molecular levels and are evident at all phenological stages of plant growth at whatever stage the water deficit takes place. The limitation of water resources in our country is one of the important issues in landscape. However, we can alleviate the adverse effects of water stress with the use of some biological and non-biological stimulators. Under severe stress conditions, the antioxidant capacity may not be sufficient to minimize the harmful effects of oxidative damage. Therefore, synthesis of signal molecules in plants is an important step in our better understanding of how plants respond to environmental stresses. Several such signal molecules have been identified in plants such as jasmonic acid, ethylene and salicylic acid (SA). SA is considered as a hormone-like substance, which plays an important role in regulating a number of plants' physiological processes including photosynthesis. Besides, L-arginine is an amino acid, which can alleviate the adverse effect of drought. Among the 21 proteinogenic amino acids, arginine has the highest nitrogen to carbon ratio, which makes it especially suitable as a storage form of organic nitrogen. Synthesis in chloroplasts via ornithine is apparently the only operational pathway to provide arginine in plants. Therefore, the present study was conducted to evaluate the effect of salicylic acid (SA) and L-arginine on morpho-physiological properties of *C. roseus*.

Materials and Methods: This experiment was carried out as a factorial with two factors including the foliar application at five levels (control, L-arginine 1.5 and 3 mM, SA 100 and 200 mg /L) and water stress at three levels (100, 70 and 40% field capacity (FC)) in a completely randomized design with three replications. Water use efficiency (WUE), the root/shoot weight, flower number, flower diameter, leaf chlorophyll content, peroxidase and superoxide dismutase activity of leaf, and leaf macronutrients (nitrogen, phosphorus and potassium) were measured.

Results and Discussion: The results showed that WUE in plants under moderate stress (70% FC) was higher than the plants in control and severe drought condition (40% FC). Root/shoot weight at no foliar application (control) × 40% FC and L-arginine 1.5 mM × 40% FC was higher than other treatments. The number of flowers in the treatments of 100% FC and 70% FC was more than 40% FC. The highest flower diameter was obtained from the L-arginine 3 mM. Total chlorophyll of L-arginine 3 mM was higher relative to other treatments. Drought stress significantly increased the activity of antioxidant enzymes. The lowest amount of phosphorus and nitrogen was observed at no foliar application × 40% FC. Therefore, according to the optimum application of water and amendment substrates, at 70% FC stress, L-arginine 3 mM and SA 100 mg /l increased the nitrogen and phosphorus content. Overall, L-arginine 3 mM and SA 100 mg /l increased the flower number and flower diameter significantly. Accumulation of these organic solutes either actively or passively helps the plants to retain water within cells and protect cellular compartments from injury caused by dehydration or maintain turgor pressure during water stress. Turgor maintenance plays an important role in drought tolerance of plants which may be due to its involvement in stomatal regulation and hence photosynthesis. Foliar application with arginine resulted in elevated proline levels and radiotracer experiments demonstrated that both 3H and 14C from arginine can be recovered as proline. The physiological relevance and the biochemical pathway of the conversion of arginine to proline in plants remain unclear. The most prominent hypothesis is that ornithine, derived from arginine catabolism, is converted by δ OAT to GSA/P5C, which then serves as substrate for proline synthesis by P5CR. This model has been doubted, since Arabidopsis δ OAT was found to be exclusively localized in mitochondria, while P5CR is localized in the cytosol.

1 and 2- M.Sc. Graduate of Horticulture and Assistant Professor, Department of Horticulture Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, respectively.

(*- Coresponfing Author Email: kalatejari@yahoo.com)

3- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Tehran

Conclusion: The findings of our study showed that water stress can morphologically and physiological change *C. roseus*. There was no significant difference between 70% and 100% FC for root/shoot, flower number and flower diameter traits. So, we can reduce the use of water to 70% FC increased the flower number and flower diameter and can be used to alleviate the adverse impact of water stress.

Keywords: Growth stimulators, Macronutrients, Total chlorophyll, Water use efficiency



مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی هفت جمعیت گیاه دارویی پای خر (*Tussilago farfara* L.) کشت شده در شرایط آب و هوایی تهران

محمد نورانی یزن آباد^۱ - محمدتقی عبادی^۲ - مهدی عیاری نوش آبادی^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹

چکیده

گیاه دارویی پای خر با نام علمی *Tussilago farfara* L. چندساله و از تیره کاسنی (Asteraceae) می باشد. پای خر مصارف دارویی دارد و از زمان های بسیار دور برای درمان سرفه، مشکلات ریوی و خلط استفاده می شود. در این تحقیق برای کشت پای خر، از ریزوم این گیاه استفاده شد و آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت که تیمارها عبارت از هفت جمعیت از شهرهای فیروزکوه، نور، دیلمان، کلیبر، نمین، دماوند و پل زنگوله گیاه پای خر کشت شده در تهران بودند. صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مانند سطح برگ، تعداد گل در بوته، قطر گل، طول ساقه گل دهنده، ارتفاع گل، وزن خشک گل، طول ریشه و میزان فتوسنتز اندازه گیری شد. برگ و گل گیاهان کشت شده برای بررسی فیتوشیمیایی مانند فنول و فلاونوئید کل آماده گردید. نتایج مربوط به گیاهان کشت شده نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد بین جمعیت ها وجود داشته و جمعیت پل زنگوله از لحاظ برخی خصوصیات مورفولوژیکی مانند تعداد گل در بوته با میانگین ۱۵، بیشترین قطر و ارتفاع گل به ترتیب با میانگین ۱۲ و ۱۶ میلی متر، وزن خشک گل با میانگین ۵/۲ گرم و همچنین بالاترین میزان فتوسنتز، به عنوان جمعیت برتر در بین گیاهان کشت شده مشخص گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین فنول و فلاونوئید کل جمعیت های مورد بررسی اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته و جمعیت نور با میانگین ۲۴۲ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره خشک بیشترین مقدار فنول کل را داشت و عصاره برگ جمعیت نور با IC₅₀ برابر با ۲۷۱، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد.

واژه های کلیدی: بررسی فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول کل، *Tussilago farfara* L.

مقدمه

چالوس، سیاه بیشه و دامنه های مرطوب کندوان بیان کرده است (۳). برگ ها و گل های پاخری خاصیت دارویی دارند و از مواد مؤثره این گیاه برای معالجه سرفه های خشک و درمان التهاب های دهان، گلو و مجاری تنفسی استفاده می شود. مواد مؤثره پاخری خاصیت ضد عفونی کنندگی نیز دارد. عصاره *T. farfara* دارای ترکیبات فعال زیستی مانند موسیلاژ (پلی ساکاریدهای محلول در آب) و فنولیک ها (فلاونوئیدها، تانن ها و اسیدهای فنولی) می باشد (۱). از عصاره پاخری در صنایع بهداشتی و آرایشی در تهیه شامپوهای گیاهی و کرم استفاده می شود (۴). *T. farfara* یکی از گیاهان دارویی رایج مورد استفاده در چین، شمال آفریقا، سیبری و اروپا بوده و جوانه گل آن بیش از ۲۰۰۰ سال است که برای درمان سرفه، خلط، برونشیت و شرایط مربوط به آسم استفاده می شود (۵). برگ پاخری به طور سنتی برای درمان عفونت نایژه استفاده می شود (۶). برگ *T. farfara* طیف گسترده ای از فعالیت علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را به نمایش گذاشته و نتایج استفاده از این گیاهان در طب سنتی برای درمان بیماری های مختلف ریه و عفونت های تنفسی را تأیید می کند (۷).

گیاه *Tussilago farfara* L. با نام فارسی پای خر (Coltsfoot) گیاه علفی چندساله از خانواده کاسنی (Asteraceae) می باشد. این گیاه گونه ای مهاجم بوده و در غرب و شمال آسیا، شمال آفریقا و اروپا گسترش دارد (۱). برگ ها، دمبرگ دار و کرک دار، ساقه گل دهنده به طول ۵-۱۵ سانتی متر، پوشیده با برگ های فلسی شکل ارغوانی می باشد (۲). پای خر دارای ریزوم های منشعب نازک بوده و گل های زرد (کاپیتول) در حال توسعه در اوایل بهار قبل از برگ ها ظاهر می شوند (۱). پراکندگی جغرافیایی آن در ایران، نواحی مرطوب استان های گلستان، مازندران و منطقه آذربایجان و ارتفاعات البرز می باشد (۲). زرگری، پراکنش گیاه پای خر را غالب نواحی ایران از شمیرانات، راه

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(*)- نویسنده مسئول: (Email: m.ayyari@modares.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.76027

وزن ۱۰۰ گل تازه اندازه گیری نمود.

با توجه به پتانسیل‌های گیاه پای خر در صنایع دارویی و بهداشتی و لزوم بررسی مواد موثره گیاهان دارویی در شرایط اقلیمی ایران، این تحقیق انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کشت و کار

برای اجرای این پژوهش، ریزوم گیاه پای خر در خرداد سال ۱۳۹۵ از هفت منطقه اصلی رویش این گیاه در ایران جمع‌آوری شد. سپس ریزوم‌ها در گلدان‌های هم‌شکل با اندازه دهانه ۲۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۱/۵ سانتی‌متر در بستر خاک و پرلایت در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کشت گردید. در مهر ماه همان سال گیاهانی که به اندازه کافی ریزوم و اندام هوایی تولید کرده بودند، به محل اصلی کشت در مزرعه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در پیکان شهر منتقل گردید (شکل ۱) و آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با روش LSD و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. اطلاعات مربوط به مناطق جمع‌آوری نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است.

اندازه‌گیری برخی از فاکتورهای مورفولوژیک و

فیزیولوژیک گیاهان کشت شده

در این پژوهش برخی پارامترهای مورفولوژیک مانند سطح برگ، وزن تر و وزن خشک برگ، وزن تر و وزن خشک ریشه، طول ریشه، تعداد گل در بوته، قطر گل، طول ساقه گل‌دهنده، ارتفاع گل، میزان کلروفیل و همچنین میزان فتوسنتز گیاهان کشت شده در مزرعه مورد بررسی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک ذکر شده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ^۱، ترازو، خط‌کش و کولیس دیجیتال استفاده گردید. همچنین جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل از دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD) مدل CCM-200، ساخت شرکت Opti-Sciences و برای اندازه‌گیری میزان فتوسنتز از دستگاه لایکور (Li-cor) مدل Li-6400 استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای SAS نسخه ۹/۲ و SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2016 و برای تعیین همبستگی بین صفات از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ استفاده گردید.

عصاره استونی برگ *T. farfara* اثر بیشتری در برابر رادیکال‌های آزاد داشته است. عصاره ریشه *T. farfara* فعالیت ضد رادیکال بسیار پایینی در مقایسه با عصاره گل و برگ دارد (۸). عصاره *T. farfara* حاوی ترکیبات با ارزش آنتی اکسیدانتی فعالی است، که می‌تواند در پیشگیری یا کند کردن پیشرفت استرس‌های اکسیداتیو مختلف مفید باشد (۹).

در تحقیقی که هلبا و همکاران (۱۰) انجام دادند، در میان اسیدهای فنولی شناسایی شده، اسیدگالیک با بالاترین مقدار در *T. farfara* شناسایی گردید. بسیاری از گیاهان دارویی حاوی مقادیر زیادی آنتی اکسیدان‌ها مانند پلی فنول‌ها هستند که می‌توانند نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، دفع اکسیژن منفرد و سه‌تایی (Singlet and triplet oxygen) و یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند (۸). فنول‌ها بزرگترین گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که به عنوان ضد آلودگی، ضد التهاب، ضد میکروب، ضد باکتری، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی مطرح هستند و با جلوگیری از سختی عروق، در درمان بیماری‌های قلبی - عروقی موثر می‌باشند (۱۱).

افزایش تقاضای صنایع برای مواد خام یکنواخت و با کیفیت بالا، تمایل کمتر مردم به جمع‌آوری گیاهان وحشی و نیاز برخی گیاهان وحشی به حفاظت و مراقبت، باعث کشت و اهلی‌سازی گیاهان دارویی شده است. اهلی‌سازی گیاهان دارویی، نیازمند کشت این گیاهان در خارج از منطقه بومی آن‌ها می‌باشد (۱۲). شناسایی رویشگاه‌های مختلف و ارزیابی تاثیر عوامل محیطی بر صفات ریختی و عملکرد کمی و کیفی مواد موثره گیاهان دارویی، کمک مهمی برای اهلی کردن و حفظ تنوع ژنتیکی این گیاهان به حساب می‌آید (۱۳). پژوهش‌های زیادی در مورد بررسی خصوصیات مورفولوژیک و عملکردی گیاهان مختلف انجام گردیده است. سلامتی و یوسفی (۱۴) صفات مورفولوژیک از قبیل ارتفاع بوته بر حسب سانتی‌متر، قطر ساقه بر حسب میلی‌متر، تعداد شاخه‌های جانبی، تعداد برگ، وزن هزار دانه بر حسب گرم، وزن تر و خشک گیاه بر حسب گرم، عملکرد اسانس بر حسب میلی‌لیتر در صد گرم ماده خشک را در گیاه بادرشوبیه (*Dracocephalum moldavica* L.) اندازه‌گیری کردند. تاننورک و وه‌دین (۱۵) در مطالعه روی گلرنگ، بین عملکرد دانه با تعداد شاخه، تعداد قوزه در بوته، تعداد دانه در قوزه و وزن هزار دانه همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده کردند. پیرخضری و همکاران (۱۶) به بررسی صفاتی از جمله ارتفاع، قطر گل، قطر نهج، تعداد گل‌های زبانه ای، تاریخ شروع گلدهی، عملکرد گل در بوته، تعداد گل در بوته، وزن ۱۰۰۰ دانه، طول روزنه، طول و عرض برگ، طول دمبرگ و تیپ نهج در گل بابونه پرداختند. در پژوهشی دیگر آندرا (۱۷) به بررسی تنوع مورفولوژیک در دو رقم دیپلوئید و دو رقم تتراپلوئید بابونه آلمانی کشت شده در جنوب ایتالیا پرداخت و صفاتی مانند ارتفاع بوته، تعداد پنجه، تعداد گل در بوته، قطر و ارتفاع گل و



شکل ۱- تکثیر گیاه پای خر با ریزوم در گلخانه و انتقال به مزرعه

Figure 1- Propagation of tussilago farfara by rhizome in the greenhouse and transfer to the field

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری و محل کشت گیاه پای خر

Table 1- Geographical characteristics of sample collection sites of *Tussilago farfara* L.

محل جمع‌آوری Sampling location	استان Province	ارتفاع Height (m)	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	میانگین دمای سالانه Annual average temperature (C°)	میانگین بارش سالانه Average precipitation (mm)
کلیبر Kaleybar	آشرفی East Azerbaijan	1821	38°50'12"	47°00'41"	11.2	422
نمین Namin	اردبیل Ardabil	1502	38°26'48"	48°33'48"	9	350
دماوند Damavand	تهران Tehran	1982	35°43'05"	52°03'53"	12.1	149
فیروزکوه Firuzkuh	تهران Tehran	2258	35°52'25"	52°43'50"	12.7	136
دیلمان Deylaman	گیلان Gilan	1821	36°53'20"	49°54'27"	12.2	369
پل زنگوله Pol-e Zanguleh	مازندران Mazandaran	2010	36°48'11"	51°20'17"	10.7	1081
نور Nur	مازندران Mazandaran	229	36°28'29"	51°54'53"	16.1	927
محل کشت Place of cultivation	تهران Tehran	1269	35°44'17"	51°10'23"	16.4	220

عصاره متانولی گل و برگ جمعیت‌های مختلف پای خر و دو گیاه رزماری و آویشن دنايي با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۳۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر متانول تهیه شد. در این مرحله DPPH با غلظت

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای این منظور از DPPH (2,2-Diphenyl- Picryl-) برای این منظور استفاده شد (۱۸). ابتدا Hydrazy که یک نوع رادیکال آزاد است، استفاده شد (۱۸). ابتدا

خوانده شد. همچنین با استفاده از منحنی استاندارد کوئرسیتین که با غلظت های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه شده بود، محاسبه و بر حسب میلی گرم کوئرسیتین اکی والان در یک گرم خشک عصاره گزارش گردید.

نتایج و بحث

نتایج صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی داری بین جمعیت های مورد بررسی از نظر خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه پای خر نشان داد، به طوری که مقادیر سطح برگ، وزن خشک برگ، وزن خشک ریشه، طول ریشه، تعداد گل در بوته، قطر گل، طول ساقه گل دهنده، ارتفاع گل، میزان کلروفیل و همچنین میزان فتوسنتز جمعیت های کشت شده در مزرعه با یکدیگر اختلاف معنی داری در سطح یک درصد نشان دادند. مقایسه میانگین صفات بررسی شده (جدول ۲) نشان داد که بیشترین سطح برگ مربوط به جمعیت نمین با مقدار ۶۱ سانتی متر مربع و کمترین مقدار مربوط به جمعیت دیلمان با ۲۹ سانتی متر مربع بود (شکل ۲). تاکنون گزارشی مبنی بر مقایسه خصوصیات مورفولوژیک گیاه پای خر از جمله سطح برگ بیان نشده است. به دلیل یکسان بودن شرایط آب و هوایی و کشت و کار گیاهان کشت شده در مزرعه، می توان دلیل بالا بودن سطح برگ جمعیت نمین را، توانایی بالای ریزوم گیاهان این جمعیت در جذب آب و مواد غذایی و همچنین سازگاری گیاه به شرایط مزرعه بیان کرد.

جمعیت نمین با ۰/۷ گرم، بالاترین میزان وزن خشک برگ را داشت، اما جمعیت نور و دیلمان با مقدار ۰/۳ گرم، کمترین میزان وزن خشک برگ را در بین جمعیت های کشت شده نشان داد (شکل ۳). علاوه بر دلایلی که برای بالا بودن سطح برگ در جمعیت نمین ذکر گردید، می توان پایین بودن دمای منشاء گیاه کاشته شده در مزرعه را هم نام برد. بیشترین تعداد گل در بوته مربوط به جمعیت پل زنگوله با میانگین ۱۵ و کمترین مقدار برای جمعیت دیلمان با میانگین ۶/۳ بود (شکل ۴). با توجه به بالا بودن میزان فتوسنتز در جمعیت پل زنگوله و همبستگی مثبت بالایی که بین وزن خشک ریشه و تعداد گل در بوته وجود دارد، می توان این چنین تحلیل کرد که بالا بودن مقدار فتوسنتز باعث تولید بیشتر اسمولیت ها و مواد غذایی شده، در نتیجه ریزوم ها مقدار بیشتری مواد غذایی ذخیره کرده و در بهار با گرم شدن هوا، گل های بیشتری تولید کرده است. بیشترین مقدار طول ساقه گل دهنده مربوط به جمعیت پل زنگوله و فیروزکوه با مقدار به ترتیب ۶۹ و ۶۷ میلی متر بود و جمعیت نمین کمترین میزان طول ساقه را با میانگین ۴۲/۵ میلی متر داشت (شکل ۵). وجود همبستگی مثبت بالا بین فتوسنتز و طول ساقه گل دهنده ($r=0/82$) نشان می دهد که با افزایش فتوسنتز، مقدار ماده ذخیره شده در ریزوم برای رشد اندام

۴۰۰ میلی گرم بر لیتر متانول آماده گردید. سپس مخلوطی با حجم ۲۰۰ میکرولیتر حاوی DPPH و متانول به نسبت ۱ به ۱ و ۳۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ها تهیه گردید و هر کدام با سه تکرار در پلیت های ۹۶ تایی ریخته شد. نمونه ها تا یک ساعت در دستگاه شیکر انکوباتور در تاریکی قرار داده شد. جذب نمونه ها بلافاصله با دستگاه الیزاریدر در ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری گردید. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه ها با استفاده از رابطه زیر بدست آمد. از ترکیب BHT به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

$$RSC(\%) = 100 \times \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right)$$

(درصد مهار رادیکال های آزاد)

A_{blank} = جذب بلانک

A_{sample} = جذب نمونه

همچنین برای مقایسه فعالیت عصاره ها از پارامتر IC_{50} استفاده شد (IC_{50} غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد رادیکال های آزاد را مهار می کند).

سنجش ترکیبات فنولی

برای اندازه گیری میزان فنول کل از روش فولین سیکاتیو استفاده شد (۱۹). برای این کار، عصاره های نمونه خشک پای خر، رزماری و آویشن دناپی با غلظت ۰/۱ گرم در میلی لیتر متانول تهیه گردید. همچنین سدیم کربنات هفت درصد حل شده در آب مقطر در بالن ژوژه تهیه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از هر عصاره در لوله آزمایش ریخته شده، به دنبال آن دو میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر فولین اضافه گردید. با رعایت فاصله زمانی سه دقیقه بعد از اضافه شدن فولین، ۳۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات هفت درصد نیز اضافه گردید و نمونه ها در سه تکرار آماده شدند. سپس محلول حاصل به مدت دو ساعت در دستگاه شیکر انکوباتور قرار داده شد و در نهایت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. همچنین از طریق منحنی استاندارد گالیک اسید که با غلظت های ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به دست آمد، محاسبه و بر حسب اکی والان گالیک اسید در یک گرم عصاره خشک گزارش گردید.

سنجش فلاونوید کل

برای اندازه گیری فلاونوید کل از روش آلومنیوم کلرید استفاده شد (۲۰). ابتدا عصاره های پای خر با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر متانول تهیه گردید. همچنین مقدار معینی آلومنیوم کلرید دو درصد حل شده در متانول آماده گردید. سپس ۶۰۰ میکرولیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته شده، ۶۰۰ میکرولیتر آلومنیوم کلرید دو درصد اضافه گردید و نمونه ها در سه تکرار آماده شدند. محلول حاصل بعد از ۱۰ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر

میانگین بارش سالیانه با استفاده از سالنامه‌های ۱۰ ساله سازمان هواشناسی برای مناطق مورد مطالعه که در جدول ۱ آورده شده است، میانگین دمای سالانه نمین با مقدار ۹ درجه سانتی گراد کمترین درجه حرارت را دارد که می‌تواند دلیلی بر مقاوم بودن گیاه در برابر شرایط سخت محیطی و در نتیجه رشد بهتر گیاه باشد. وجود همبستگی بالا بین صفات رویشی با ارتفاع گل و وزن خشک گل نشان می‌دهد که با افزایش دوره رویشی، اجزای عملکرد گل و به دنبال آن وزن خشک گل افزایش یافته است که این نتایج همسو با یافته‌های عادل و همکاران (۲۴) بر روی جمعیت‌های بابونه می‌باشد.

نتایج این بررسی نشان داد که میزان غلظت نسبی کلروفیل در جمعیت فیروزکوه دارای بیشترین مقدار و در جمعیت نور کمترین مقدار است. با توجه به این که جمعیت نور دارای بیشترین ترکیبات فنولی بود، می‌توان بیان کرد که، وجود این ترکیبات به همراه دیگر ترکیباتی که باعث از بین رفتن کلروفیل از جمله کلروفیل a و b می‌شوند، باعث کاهش غلظت کلروفیل در جمعیت نور شده است. این نتایج با گزارش احمدی و سی و سه مرده (۲۵) که بر روی گندم تحت تنش در شرایط اقلیمی ایران مطالعه داشتند، مطابقت دارد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که جمعیت پل زنگوله بالاترین میزان فتوسنتز را در بین جمعیت‌های کشت شده نشان داد. نتایج تجزیه داده‌های مربوط به تعداد گل در بوته، طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل، ارتفاع گل و وزن خشک ۵۰ گل نشان داد که جمعیت پل زنگوله دارای تعداد گل بیشتری در بوته، بالاترین طول ساقه گل‌دهنده، قطر گل، ارتفاع گل و وزن خشک ۵۰ گل در بین جمعیت‌های مورد بررسی است. با توجه به همبستگی مثبت بالایی که بین میزان فتوسنتز و طول ساقه گل‌دهنده وجود دارد ($r = 0.82$)، می‌توان دلیل بیشتر بودن مقدار ساقه گل‌دهنده را بالا بودن فتوسنتز و به دنبال آن تولید و ذخیره مواد مورد نیاز برای رشد در ریزوم‌ها بیان کرد. وزن خشک ریشه همبستگی مثبت بالایی با تعداد گل در بوته و وزن خشک ۵۰ گل نشان داد. بنابراین می‌توان گفت که داشتن ریزوم‌های قوی، تولید گل بیشتری را به دنبال خواهد داشت. چون طول ریشه همبستگی معنی‌داری با صفات ذکر شده نداشت، می‌توان بیان کرد که هرچه ریزوم سنگین‌تر و بزرگ‌تر باشد تولید گل بیشتر با وزن خشک بالا خواهیم داشت. همچنین جمعیت پل زنگوله به دلیل نتایج خوبی که در مورد اندام گل نشان داد، جمعیت مناسب برای تولید گل با عملکرد بالا است.

هوایی و گلدهی نیز بیشتر شده و در نهایت ساقه گل‌دهنده جمعیت پل زنگوله رشد بیشتری کرده است (جدول ۳). جمعیت پل زنگوله با میانگین ۱۲ میلی‌متر، بیشترین قطر گل و جمعیت فیروزکوه با میانگین ۸/۷ میلی‌متر کمترین میزان قطر گل را داشت (شکل ۶). بیشترین میزان ارتفاع گل مربوط به جمعیت پل زنگوله با ۱۶ میلی‌متر و کمترین ارتفاع گل برای جمعیت دیلمان با ۱۴/۶ میلی‌متر بود (شکل ۷). بیشترین وزن خشک گل مربوط به جمعیت پل زنگوله با میانگین ۵/۲ گرم و کمترین مقدار مربوط به جمعیت نور با میانگین ۴ گرم بود (شکل ۸). جمعیت فیروزکوه دارای بیشترین وزن خشک ریشه با میانگین ۱ گرم و جمعیت نور دارای کمترین مقدار وزن خشک ریشه با میانگین ۰/۷ گرم می‌باشد (شکل ۹). بیشترین طول ریشه مربوط به جمعیت‌های نمین و دماوند با میانگین ۱۵ سانتی‌متر و کمترین مقدار مربوط به جمعیت دیلمان با میانگین ۹/۸ سانتی‌متر می‌باشد (شکل ۱۰). بیشترین میزان کلروفیل مربوط به جمعیت فیروزکوه با میانگین ۱۲۲ و کمترین مقدار برای جمعیت نور با میانگین ۸۵ می‌باشد (شکل ۱۱). جمعیت پل زنگوله دارای بیشترین فتوسنتز و جمعیت دماوند دارای کمترین میزان فتوسنتز بودند (شکل ۱۲).

نتایج تجزیه واریانس حاکی از وجود تنوع قابل ملاحظه جمعیت‌های پای خر برای صفات مورد بررسی است. این تنوع ممکن است به دلیل اختلافات جمعیتی افراد، یا به علت اختلافات شرایط محیطی و یا گاهی توسط اثرات متقابل جمعیت و محیط به وجود آمده باشد (۲۱). طبق جدول تجزیه واریانس، همه صفات مورفولوژیکی ارزیابی شده در این تحقیق دارای اختلاف معنی‌داری بودند. تاکنون گزارشی مبنی بر مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی گیاه پای خر بیان نشده است. با این حال این با نتایج مهدیخانی و همکاران (۲۲) و محمدی و همکاران (۲۳) بر روی توده‌های گیاه بابونه مطابقت دارد. این محققان صفات مورفولوژیک را در گیاه بابونه بررسی کردند و گزارش دادند که بیشتر صفات مورد بررسی معنی‌دار گردید. نتایج این بررسی نشان داد که سطح برگ و وزن خشک پای خر در جمعیت‌های کشت شده دارای تفاوت زیادی می‌باشد و گیاهان کشت شده از جمعیت نمین دارای بیشترین سطح برگ و وزن خشک برگ بود. به دلیل یکسان بودن شرایط آب و هوایی و کشت و کار گیاهان کشت شده در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، می‌توان دلیل این برتری را توانایی بالای ریزوم جمعیت نمین در جذب آب و مواد غذایی و همچنین سازگاری گیاه به شرایط مزرعه بیان کرد. همچنین بر اساس داده‌های مربوط به درجه حرارت و

جدول ۲- میانگین، حداقل، حداکثر و ضریب تغییرات صفات ارزیابی شده پای خر به همراه علامت اختصاری

Table 2- Average, minimum, maximum and coefficient of variation of *Tussilago farfara* L. traits with their symbols

ضریب تغییرات CV	حداکثر Max	حداقل Min	میانگین Average	واحد Unit	Symbol	صفت Trait	صفت Trait
5.67	61.26	29.13	46.13	Cm ²	LA	Leaf area	سطح برگ
20.99	0.67	0.29	0.5	G	LDW	Leaf dry weight	وزن خشک برگ
2.14	121.96	85.67	105.81	—	CC	Chlorophyll concentration	غلظت کلروفیل
2	8.69	4.48	6.5	$\mu\text{molCo}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	P	Photosynthesis	میزان فتوسنتز
19.22	14.67	3.66	9.38	—	NF/P	Number of flowers per plant	تعداد گل در بوته
3.37	69	42.5	55.73	Mm	SH	Stem height	طول ساقه گل‌دهنده
4.42	12.02	8.48	9.74	Mm	FD	Flower diameter	قطر گل
0.94	16.01	14.58	15.33	Mm	FL	flower length	ارتفاع گل
3.21	4	5.23	4.62	G	FDW	Flower dry weight	وزن خشک ۵۰ گل
5.46	1.04	0.65	0.86	G	RDW	Root dry weight	وزن خشک ریشه
11.21	15	9.83	12.33	Cm	RL	Root length	طول ریشه

جدول ۳- ضرایب همبستگی ساده بین ۱۱ صفت اندازه‌گیری شده در گیاه پای خر

Table 3- Simple correlation coefficients between 11 measured traits of *Tussilago farfara* L.

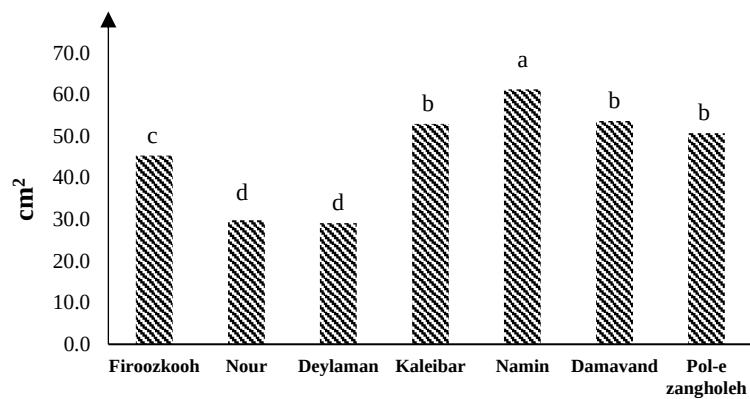
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.00										
2	0.877**	1.00									
3	0.014 ^{ns}	0.052 ^{ns}	1.00								
4	-0.293 ^{ns}	-0.338 ^{ns}	0.110 ^{ns}	1.00							
5	0.661**	0.390 ^{ns}	0.291 ^{ns}	0.054 ^{ns}	1.00						
6	-0.286 ^{ns}	-0.211 ^{ns}	0.301 ^{ns}	0.822**	-0.191 ^{ns}	1.00					
7	0.542*	0.385 ^{ns}	0.70 ^{ns}	0.670 ^{ns}	0.580**	0.146 ^{ns}	1.00				
8	0.679**	0.554**	-0.342 ^{ns}	-0.370 ^{ns}	0.534*	-0.090 ^{ns}	0.791**	1.00			
9	0.834**	0.734**	0.480 ^{ns}	0.028 ^{ns}	0.799**	-0.012 ^{ns}	0.739**	0.688**	1.00		
10	0.492 ^{ns}	0.357**	0.503*	0.337 ^{ns}	0.579**	0.304 ^{ns}	0.388 ^{ns}	0.214 ^{ns}	0.605**	1.00	
11	0.665**	0.584**	-0.143 ^{ns}	-0.316 ^{ns}	0.138 ^{ns}	-0.222 ^{ns}	0.198 ^{ns}	0.360 ^{ns}	0.340 ^{ns}	0.367 ^{ns}	1.00

۱- سطح برگ ۲- وزن خشک برگ ۳- غلظت کلروفیل ۴- میزان فتوسنتز ۵- تعداد گل در بوته ۶- طول ساقه گل‌دهنده ۷- قطر گل ۸- ارتفاع کاپیتول ۹- وزن خشک پنجاه گل ۱۰- وزن خشک ریشه ۱۱- طول ریشه

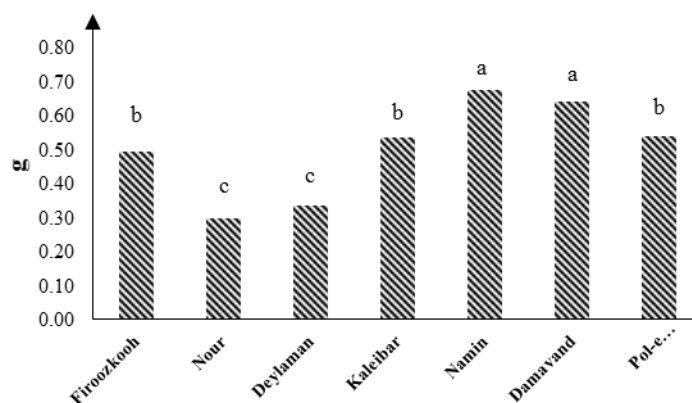
1- Leaf area 2- Leaf dry weight 3- Chlorophyll Concentration 4- Photosynthesis rate 5- Flowers per plant 6- Stem height 7- Flower diameter 8- Flower length 9- Flower dry weight 10- Root dry weight 11- Root length

*, **, و ns به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد و غیر معنی‌دار.

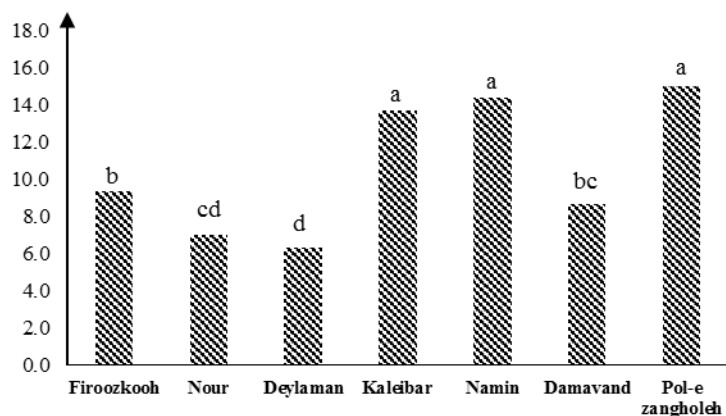
*, **, and ns significant at 5%, 1% level of probability and non-significant, respectively.



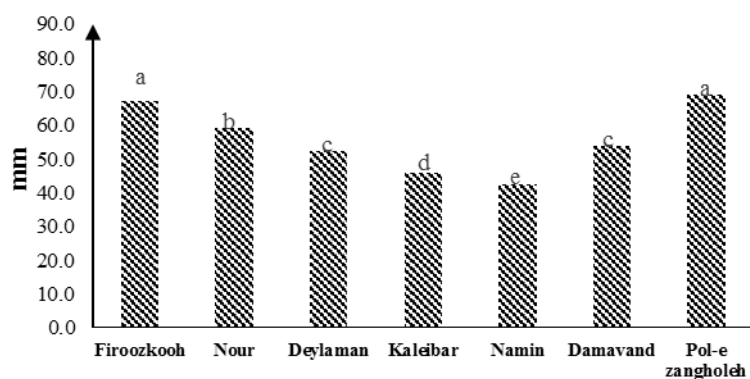
شکل ۲- سطح برگ در جمعیت‌های بررسی شده
Figure 1- Leaf area in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۳- وزن خشک برگ در جمعیت‌های بررسی شده
Figure 2- Leaf dry weight in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)

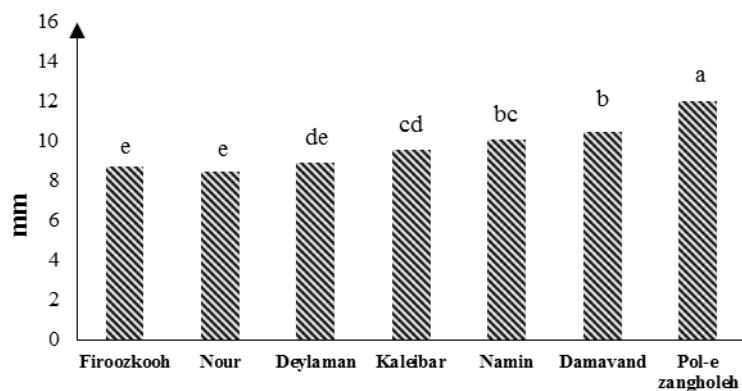


شکل ۴- تعداد گل در بوته در جمعیت‌های بررسی شده
Figure 4 - The number of flowers per plant in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



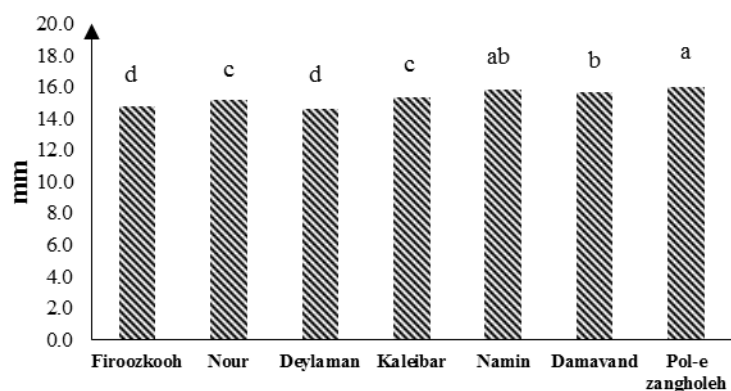
شکل ۵- طول ساقه گلدهنده در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 5- The length of the stem in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



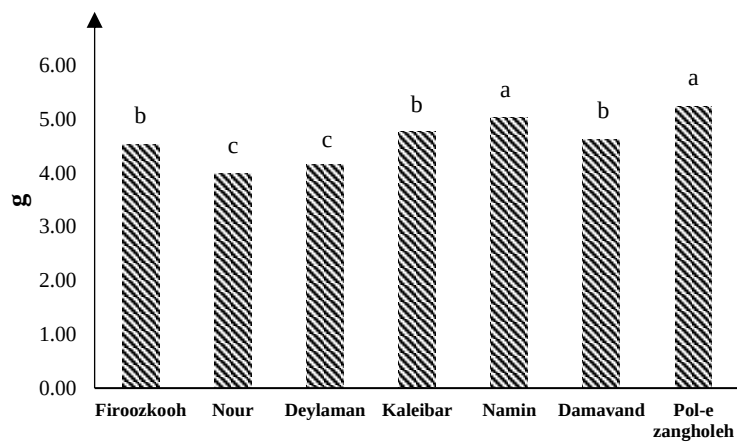
شکل ۶- قطر گل در بوته در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 6- Flower diameter in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



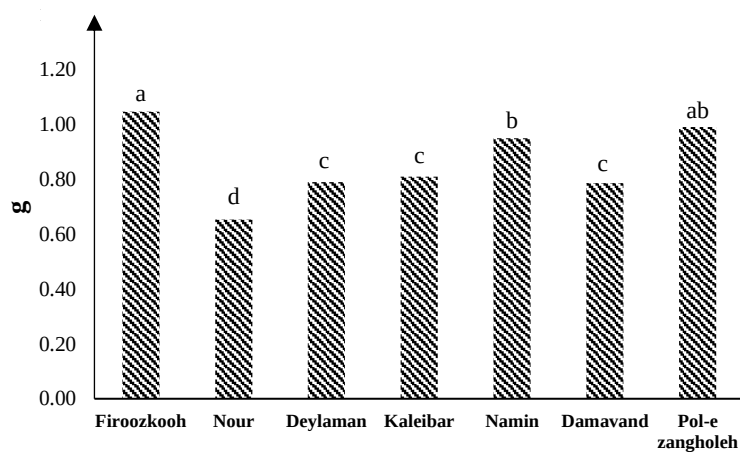
شکل ۷- ارتفاع گل در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 7- Flower height in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



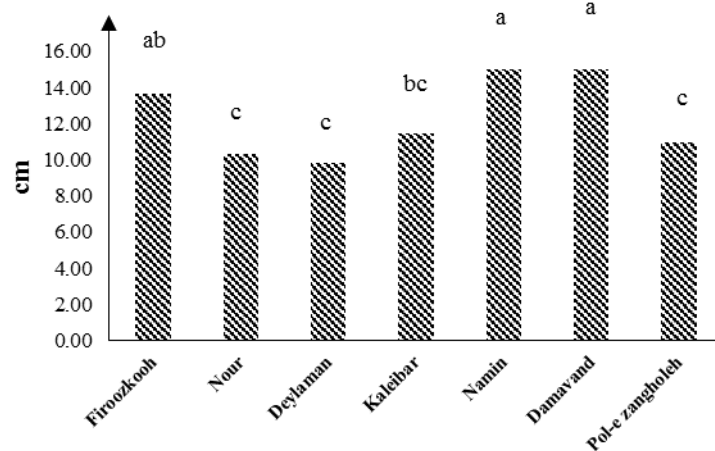
شکل ۸- متوسط وزن خشک گل در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 8- Average dry flower weight in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



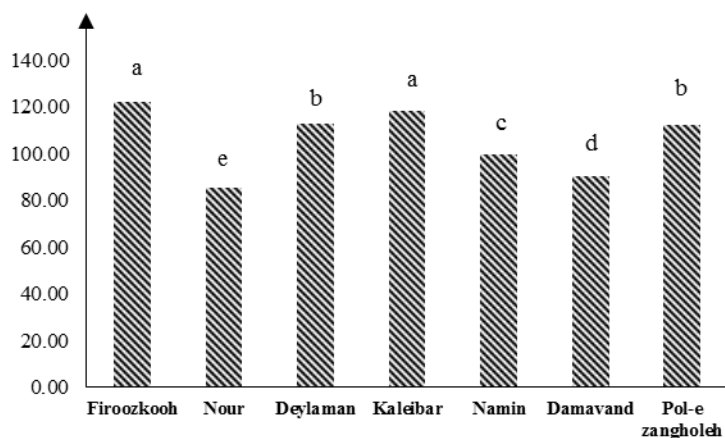
شکل ۹- وزن خشک ریشه در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 9- Root dry weight in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)

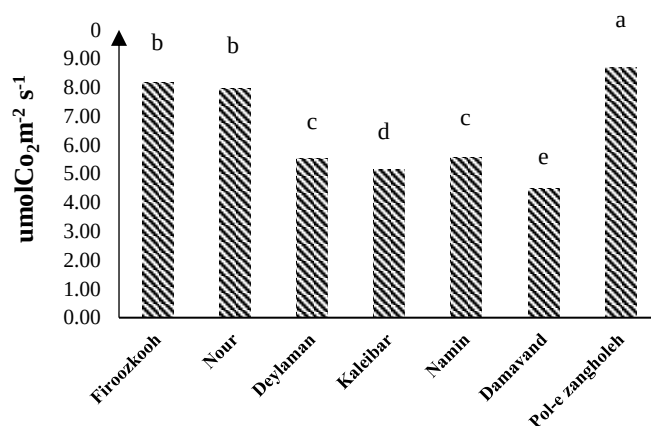


شکل ۱۰- طول ریشه در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 10- Root length in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۱۱- غلظت نسبی کلروفیل در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 11- Concentration of chlorophyll in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)

شکل ۱۲- میزان فتوسنتز در جمعیت‌های بررسی شده

Figure 12- Photosynthesis rate in studied populations (LSD, $p \leq 0.05$)

نتایج خصوصیات فیتوشیمیایی

فنول کل

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را برای مقایسه خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه پای خر نشان داد. مقایسه میانگین فنول کل عصاره جمعیت‌های مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد، به طوری که جمعیت نور با میانگین ۲۴۲ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره خشک دارای بیشترین مقدار فنول کل و جمعیت کلیر با میانگین ۱۲۵ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره خشک، دارای کمترین میزان فنول کل بود (شکل ۱۳). مقدار فنول کل رزماری و آویشن دنایی به ترتیب برابر با ۱۵۵ و ۴۶۶ میلی گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره خشک بود که نشان دهنده بالا بودن مقدار فنول کل

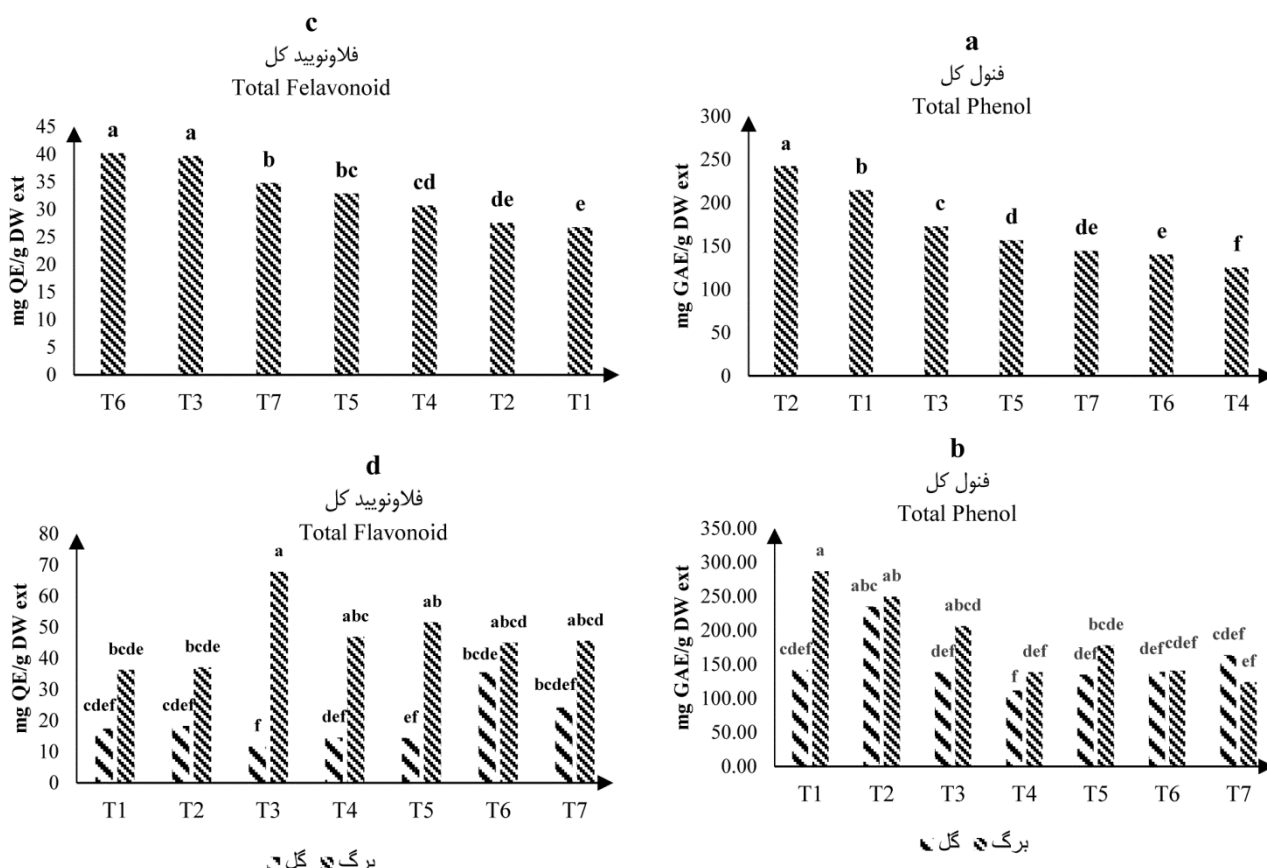
جمعیت نور نسبت به گیاه رزماری می‌باشد (شکل ۱۳). مقایسه داده‌های فنول کل بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد که جمعیت نور دارای بیشترین میزان فنول کل می‌باشد که این مقدار در برگ جمعیت نور بیشتر از اندام گل می‌باشد. در پژوهشی که خطیر نامنی و مازندرانی (۲۶) بر روی فنول کل اندام‌های مختلف گیاه شایبک انجام دادند، برگ بیشترین مقدار فنول کل را نشان داد. ژوکو و همکاران (۲۷) به بررسی میزان فنول گیاه زرشک پرداختند و نشان دادند که بیشترین مقدار فنول کل در برگ نسبت به اندام‌های دیگر بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. همچنین عصاره گل جمعیت نور در بین عصاره گل مناطق دیگر بالاترین میزان فنول کل را داشت. کمترین میزان فنول کل هم مربوط به جمعیت کلیر می‌باشد. زیستگاه گیاه از طریق تغییرات اقلیمی می‌تواند بر فرایند تشکیل متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف گیاه تأثیرگذار باشد (۲۸). از

فلاونوئید کل

مقایسه فلاونوئید کل جمعیت‌های پای خر نشان داد که جمعیت‌های دماوند و دیلمان فلاونوئید بیشتری نسبت به جمعیت‌های دیگر داشتند که این مقادیر به ترتیب برابر با ۴۰ و ۳۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک بود (شکل ۱۳). این در حالی است که مقدار فلاونوئید کل در دو گیاه رزماری و آویشن دنايي به ترتیب برابر با ۱۳ و ۲۶ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک بود (شکل ۱۴). بیشترین مقدار فلاونوئید در بین همه عصاره‌های مورد ارزیابی مربوط به عصاره برگ جمعیت دیلمان بود. عصاره گل جمعیت دماوند نیز بالاترین مقدار فلاونوئید را در بین عصاره‌های گل داشت. همچنین جمعیت فیروزکوه کمترین میزان فلاونوئید را در بین جمعیت‌های مورد مطالعه داشت.

این‌رو با توجه به اختلاف دما و میزان بارش بین منطقه نور با دیگر مناطق از جمله منطقه نمین، می‌توان منشأ تفاوت در مقدار فنول کل را به اختلاف شرایط آب و هوایی نسبت داد که تأثیرات حاصل از آن‌ها در ریزوم گیاه ذخیره شده و در سال بعد تأثیر خود را در محل کشت جدید نشان داد. به طوری‌که در بین مناطق بررسی شده، بالاترین دما و بالاترین بارش مربوط به منطقه نور می‌باشد. به نظر می‌رسد منطقه نور رویشگاه مناسبی برای گیاه پای خر می‌باشد. چون مهم‌ترین جنبه استفاده گیاه پای خر به خاطر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن است و چنانچه قبلاً هم گفته شد در اکثر موارد بین میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رابطه مستقیم وجود دارد. از این رو جمعیت نور که دارای بالاترین میزان فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، به عنوان رویشگاه مناسب می‌تواند معرفی گردد.

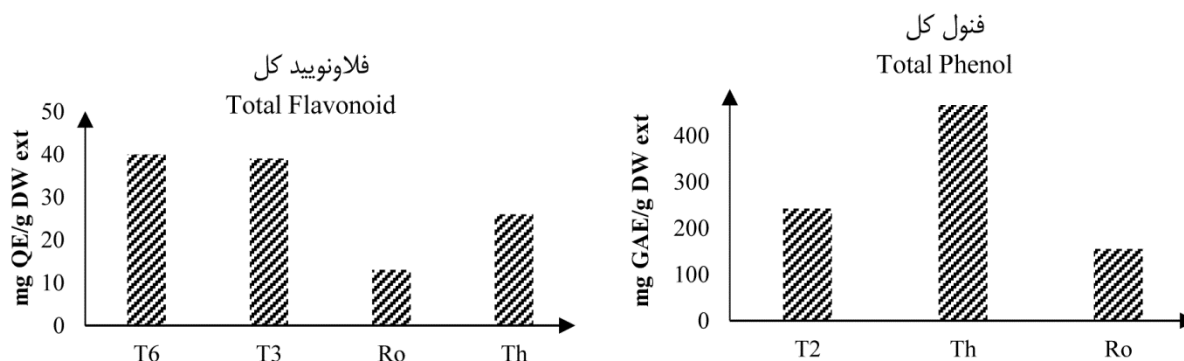
فیروزکوه: T1، نور: T2، دیلمان: T3، کلیبر: T4، نمین: T5، دماوند: T6، پل زنگوله: T7



شکل ۱۳- مقایسه مقدار فنول و فلاونوئید کل در برگ و گل جمعیت‌های بررسی شده (a) (فنول کل جمعیت)، b) (فنول کل برگ و گل) و c) (فلاونوئید کل برگ و گل) و d) گیاه پای خر

Figure 13- Comparison of total phenol and flavonoid in the leaves and flowers of cultivated of *Tussilago farfara* L. (LSD, $p \leq 0.05$)

نور: T2، دماوند: T6



شکل ۱۴- مقایسه مقدار فنول و فلاونوئید جمعیت‌های بررسی شده برتر گیاه پای خر با عصاره رزماری و آویشن دناپی

Figure 14- Comparison of total phenol and flavonoid in the better studied populations of *Tussilago farfara* with Extracts of *Rosmarinus officinalis* (Ro) and *Thymus daenensis* (Th)

عواملی هستند که می‌تواند بر میزان مواد مؤثره گیاه تأثیر زیادی داشته باشد (۲۸). مقایسه نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که بین گیاهان کشت شده از مناطق مختلف، در فعالیت آنتی اکسیدانی تفاوت وجود دارد. بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد توسط برگ جمعیت نور انجام گرفت. تفاوت در شرایط آب و هوایی از قبیل میزان بارش و رطوبت نسبی در طول فصل رشد گیاه و درجه حرارت می‌تواند دلیل تفاوت جمعیت نور با دیگر جمعیت‌های مورد بررسی باشد، چنانچه منطقه نور، بیشترین بارش را در بین مناطق مورد بررسی دارد و گیاهان حاصل از ریزوم تهیه شده از این مناطق توانسته است پتانسیل‌های بالقوه خود را در سال بعدی و محل کشت جدید نشان دهد. این نتایج مطابق با نتایج دوبراوالسکیت و همکاران (۲۹) است، آن‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه پای خر توده فرانسه با لیتوانی را مقایسه کردند و دلیل بیشتر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه پای خر فرانسه نسبت به توده لیتوانی را پایین بودن متوسط دمای لیتوانی نسبت به فرانسه و بالا بودن میزان بارندگی در فرانسه نسبت به لیتوانی بیان کردند. در همین راستا مهرپور و همکاران (۲۸) بالا بودن مقدار رطوبت نسبی را یکی از دلایل افزایش میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول کل بیان کرده است. چنانچه میانگین دمای هوا و بارندگی منطقه نور به نسبت بالاتر از مناطق دیگر بود. البته عوامل دیگری از قبیل کموتیپ گیاه، خاک و نور خورشید نیز می‌تواند در خواص و ترکیبات گیاه تأثیرگذار باشند (۲۹). دوبراوالسکیت و همکاران (۸) میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی برگ، گل و ریشه را در دو توده فرانسه و لیتوانی بررسی کردند و نتایج نشان داد عصاره متانولی این سه اندام تفاوت معنی‌داری در میزان آنتی اکسیدانی دارند. همچنین عصاره متانولی برگ پای خر در هر دو توده فرانسه و لیتوانی دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی بود که با نتیجه این

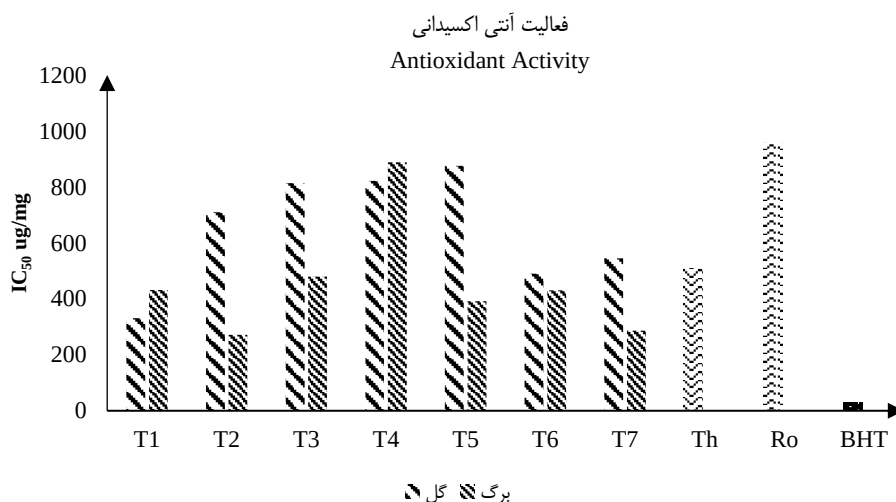
فلاونوئید عصاره گل علف سرفه قبلا توسط دوبراوالسکیت و همکاران (۲۹) اندازه‌گیری گردیده است و نتایج مقدار فلاونوئید عصاره‌های گل پای خر در این تحقیق در مورد فلاونوئید گل با نتایج دوبراوالسکیت و همکاران مطابقت دارد. آن‌ها مقدار فلاونوئید را به‌طور متوسط ۹ میلی گرم روتین در گرم ماده خشک بیان کردند. در تحقیقی که چورلی و همکاران (۱۳) بر روی فلاونوئید گل و برگ گیاه چای کوهی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که اثر رویشگاه بر روی مقدار فلاونوئید معنی‌دار نبود ولی اثر اندام معنی‌دار شد و برگ دارای فلاونوئید بیشتری نسبت به گل بود که این یافته‌ها همسو با نتایج این تحقیق می‌باشد.

فعالیت آنتی اکسیدانی

مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف حاصل از برگ و گل جمعیت‌های بررسی شده نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به عصاره برگ جمعیت نور با IC_{50} برابر با ۲۷۱ بوده و کمترین مقدار این فعالیت مربوط به عصاره برگ جمعیت کلیبر است (شکل ۱۵). مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گل در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد، که عصاره گل جمعیت فیروزکوه دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و عصاره گل جمعیت نمین، کمترین مقدار فعالیت را داشت (شکل ۱۵). مقایسه مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی برگ جمعیت نور با رزماری و آویشن دناپی که به ترتیب دارای IC_{50} ۹۵۸ و ۵۰۹ بود، نشان از فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه جمعیت نور می‌باشد. تغییرات عوامل اکولوژیکی نقش مؤثری را بر رشد و افزایش کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی دارند. در نظر گرفتن ویژگی‌های محل رویش، موقعیت جغرافیایی، اندام گیاه و تأثیر عوامل اکولوژیک بر روی گیاه در طبیعت، از عمده

مستقیم دارد (۳۱). سلیکتاس و همکاران (۳۲) بیان کردند که فعالیت آنتی اکسیدانی رزماری با محتوای فنول تام آن رابطه مستقیم دارد. درحالی که نتایج دوبراوالسکیت و همکاران (۳۹) نشان داد که مقدار فنول کل دو توده فرانسه و لیتوانی تفاوت ناچیزی داشت.

تحقیق مطابقت دارد. نتایج مربوط به فنول کل نشان داد که جمعیت نور بیشترین مقدار فنول کل را در بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد. یافته‌ها نشان می‌دهد، گیاهانی که دارای ترکیبات فنولی بالاتری هستند، فعالیت ضد رادیکال‌های آزاد بالاتری نشان می‌دهند. در بیشتر پژوهش‌های انجام گرفته، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان فنول رابطه



شکل ۱۵- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی برگ و گل جمعیت‌های بررسی شده گیاه پای خر و عصاره رزماری و آویشن دناپی
Figure 15- Comparison of antioxidant activity of leaves and flower of *Tussilago farfara* and Extracts of *Rosmarinus officinalis* (Ro) and *Thymus daenensis* (Th)

رویشگاه نور کشت و اهلی‌سازی کرد. در کشور ما توجه زیادی به گیاه پای خر نشده است و بیشتر به عنوان علف هرز مطرح می‌باشد. در حالی که پتانسیل‌های دارویی این گیاه بالا بوده و می‌تواند به عنوان یک گیاه دارویی مهم و بومی کشور تلقی شود و با اهمیت دادن به خود گیاه و رویشگاه‌های آن، از انقراض و از بین رفتن این گیاه جلوگیری گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه در گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است. همچنین از زحمات و کمک‌های آقایان دکتر علی سنبل و مهندس محسن یادگاری در طی انجام پروژه سپاسگزاری می‌شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه رویشگاه‌های گیاه پای خر و همچنین کشت آن نشان می‌دهد که این گونه نیاز رطوبتی بالایی دارد و در ارتفاعاتی که دارای هوای خنک هستند، رشد بهتری می‌کند و تقریباً در نیمه شمالی ایران توزیع شده است. با توجه به نتایج این تحقیق، گیاه پای خر یک گیاه با قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی بالا مخصوصاً در اندام برگ می‌باشد. مقایسه جمعیت‌های کشت شده در تهران نشان داد که جمعیت نور از نظر محتوای فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی، به عنوان جمعیت برتر معرفی گردیده و نیازمند مطالعه بیشتر در مورد این جمعیت و رویشگاه مربوطه می‌باشد. بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی جمعیت‌های مختلف نشان می‌دهد که رویشگاه نور محل مناسبی برای کشت پای خر برای بالا بردن میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. لذا می‌توان برای اهداف دارویی و بهداشتی، پای خر را در

منابع

- Adamcza A., Opala B., Gryszczyńska A., and Buchwald W. 2013. Content of pyrrolizidine alkaloids in the leaves of coltsfoot (*Tussilago farfara* L.) in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82(4): 289–293.
- Mozaffarian V. 2015. Recognition of medicinal and aromatic herbs in Iran. Tehran: Farhang Moaser Publishers,

- 1444 p.
- 3- Zargari A. 1998. Medicinal Plants. Tehran University Publishers, 3:926.
- 4- Omidbaigi R. 1393. Production and processing of medicinal plants. Mashhad: Astan Quds Razavi Publishers, 348 p.
- 5- Wu Q.Z., Zha D.X., Xiang J., Zhang M., Zhang C.F., and Xu X.H. 2015. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*. *Pharmaceutical Biology* 54(7):1117-24.
- 6- Lebeda R., Schreier A., Scherz S., Resch Ch., Krenn L., and Kopp B. 2000. Uantitative Analysis of the Pyrrolizidine Alkaloids Senkirkine and Senecionine in *Tussilago farfara* L. by Capillary Electrophoresis. *Phytochemical Analysis* 11: 366–369.
- 7- Turker A.U., and Usta C. 2008. Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Natural Product Research* 22(2): 136-146.
- 8- Dobravalskyte D., Talou T., and Venskutonis R. 2011. Activity of natural antioxinants extracted from greater calamint, sweet cicely and coltsfoot cultivated in Lithoania and in France. In Conference Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2011, Jelgava, Latvia, 5-6 May, 2011. Innovations for food science and production. (pp. 73-78). Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology.
- 9- Sharafzadeh S. 2011. Pyrethrum, Coltsfoot and Dandelion: Important Medicinal Plants from Asteraceae Family. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(12): 1787-1791.
- 10- Hleba L., Vukovic N., Horska E., Petrova J., Sukdolak S., and Kacaniova M. 2014. Phenolic profile and antimicrobial activities to selected microorganisms of some wild medical plant from Slovakia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(4): 269-274.
- 11- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., and Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* (579): 200–213.
- 12- Dudai N. 2012. Domestication and Breeding of Wild Medicinal and Aromatic Plants Thirty Years of Experience in Israel I International Symposium on Medicinal, Aromatic and Nutraceutical Plants from Mountainous Areas (MAP-Mountain 2011) 955. 2011.
- 13- Chorly S., Khorasani Nejad S., Hemmati Khodayar., and Kashefi B. 2015. Evaluation of morphological, antioxidant and essential oil content of *Stachys lavandulifolia* Vahl. In habitats of Semnan, North Khorasan and Razavi provinces. *Journal of Plant Environmental Physiology* 41: 52-41.
- 14- Salamati M., and Yousefi M. 2010. Evaluation of yield diversity and morphological traits of some genotypes (*Dracocephalum moldavica* L.). *Journal of Plant Research* 27(1).
- 15- Tuncturk M., and Vahdettin C. 2004. Relationships among traits using correlation and pach coefficient analysis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) sown different fertilization levels and row spacing. *Asian Journal Plant Sci*, 3(6): 683-686.
- 16- Pir Khezri M., Hasani M., and Fakhr Tabatabai M. 2009. Morphological Evaluation of Some Chamomile Species in Two Genuses of *Antimesis* and *Matricaria* in Iran (*Anthemis* spp., *Matricaria* spp.). *Journal of Horticulture (Agricultural Science and Technology)* 23: 130-119.
- 17- Andrea L. 2002. Variation of Morphology, Yield and Essential Oil Components in Common Chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) Cultivars Grown in Southern Italy. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 9(4): 359-365.
- 18- Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik L., and Jovin E.J. Agric. 2007. *Food Chem.*, 2007, 55, 7879.
- 19- Slinkard K., and Singleton V.L. Amer. 1977. *J. Enology Viticulture*, 1977, 28, 49.
- 20- Smith R.J., Winder M.L. Medicinal garden. 1996. *The National Herb Garden Guidebook*, pp. 61–71.
- 21- Ordonez A.A.L., Gomez J.D., and Vattuone M.A. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry* 97(3): 452-458.
- 22- Osmani J., and Siosemarde A. 2009. Genetic variation of Sardari wheat ecotypes using AFLP marker and agronomic traits. *Journal of Agricultural Science and Technology of Natural Resources* 13: No. 47.
- 23- Mehdikhani H., Soleuki M, and Zeynli H. 2013. Study of the genetic diversity of some chamomile masses (*Matricaria inodora* L.) using morphological traits and molecular markers of RAPD. *Genetic and Reforestation Research Institute of Iran* 21: 256-242.
- 24- Mohammadi R., Dehghani H., and Zeynli H. 2014. Study of Genetic Variability of Different Masses of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Using Morphological and Phenological Traits. *Journal of Research and Development*, No. 105.
- 25- Adeli N., Alizadeh MA., Mohammadi A., and Jafari A. 2013. Evaluation of morphological, phenological and essential oil characteristics of some populations of *Anthemis haussknechtii*. *Research and Engineering*, No. 106.
- 26- Ahmadi A., and Siosemarde A. 2003. Effect of drought stress on soluble carbohydrates, chlorophyll and proline in four wheat cultivars compatible with different climatic conditions of Iran. *Journal of Iranian Agricultural Science* 35: 763-753.

- 27- Khatir Nameni M., and Mazandarani M. 2011. Of total flavonoids and phenolic different organs of medicinal plant Deadly nights hade (*Atropa belladonna* L.) in the jungle province Tvskstan. National Conference on Medicinal Plants 2: 2-7.
- 28- Zovko Koncic M., Kremer D., and Karlovic K. 2010. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. Food and Chemical Toxicology (48): 2176-21.
- 29- Mehpour M., Kashefi B., and Moghadam M. 2015. Study of phytochemical and antioxidant compounds of various organs of *Ferula assafoetida* L. in two natural habitats of Semnan and Khorasan provinces. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants 13(1): 58-68.
- 30- Dobravalskyte D., Venskutonis P.R., Talou T., Zebib B., Merah O., and Ragazinskiene O. 2013. Antioxidant Properties and Composition of Deodorized Extracts of *Tussilago farfara* L. Records of Natural Products 7.3: 201.
- 31- Jamshidi M., Ashtiani H., Rezazadeh R., Fathi Azad., F Mazandarani., and Khaki A. 2009. Investigation and comparison of phenolic compounds and antioxidant activity of some native plants of Mazandaran. Journal of Medicinal Plants 9(34): 178-182.
- 32- Yesil-Celiktas O., Girgin G., Orhan H., Wichers H. J., Bedir E., and Vardar-Sukan F. 2007. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting time. Eur Food Res Technology 224: 443-451.



Cultivation and Comparing Morphological and Phytochemical Characteristics of Seven Population of *Tussilago farfara* L. in Tehran Climate Conditions

M. Norani¹- M.T. Ebadi²- M. Ayyari Noushabadi^{3*}

Received: 24-10-2018

Accepted: 31-07-2019

Introduction: Coltsfoot (*Tussilago farfara* L.) from Asteraceae family is a perennial plant. *T. farfara* is native and widespread from Europe to Western and Northern Asia and North Africa. Coltsfoot distributed in wet mountainous regions of Iran, such as Azerbaijan, Tehran and Northern provinces. Its flowers and leaves have been used traditionally for the treatment of cough, bronchitis and phlegm disorders. *T. farfara* leaves and flowers have expectorant activity and are used for chronic dry cough and various pulmonary diseases. The extracts of *T. farfara* were shown to exhibit various activities, such as antioxidant and antimicrobial activity. Biologically active agents of *T. farfara* have been studied due to their antimicrobial and antioxidant characteristics.

Materials and Methods: For morphological study, the rhizomes of seven Iranian coltsfoot populations were collected in August 2016 from different regions of Iran including Pol-e zangholeh, Damavand, Firoozkooh, Nur, Deylaman, Kaleybar and Namin. The collected samples were planted in the same condition during 2016-2017 in research field of Tarbiat Modares University in Tehran (51°10'23" N, 35°44'17" E), with a randomized complete block design experiment and three replications. The average annual rainfall and temperature of cultivating place is about 220 mm and 16.4 °C. In order to study the morphological characteristics between different samples, traits such as the number of flowers per plant, stem height, flower length, flower diameter, flower dry weight, root length, root dry weight, leaf area and leaf dry weight had been measured. Morphological traits were measured under the same conditions and for this research, were used ruler, caliper and balance. The leaves and flowers were prepared for phytochemical studies. DPPH method has been used to evaluate the antioxidant activity, and the IC₅₀ was used to compare the antioxidant properties. The absorbance of the samples was measured at 517 nm with ELISA reader. The radical scavenging capacity (RSC) was calculated by the following formula: % In=[(A_b-A_s)/A_b]×100, where In is DPPH inhibition, A_b is the absorbance of the blank, A_s is the absorbance of samples including extracts and BHT as a positive control. The phenolic contents of different extracts were determined by Folin-Ciocalteu method and the aluminum chloride method was used to measure total flavonoid.

Results and Discussion: Analysis of variance showed that there is a significant difference between all evaluated traits in studied populations ($p \leq 0.01$). Pol-e zangholeh population of *T. farfara*, has shown the best performance for all morphological traits. The results of the flowers per plant showed that the Pol-e zangholeh population was the highest and the Deylaman population had the lowest number of flowers. The maximum length of the stem was related to the Pol-e zangholeh population while the population of Namin had the smallest amount. Comparison of flower diameter showed that the Pol-e zangholeh population had the largest diameter and Nur population of all the smaller. The results of the flower length showed that the maximum flower length was related to the Pol-e zangholeh population and Deylaman population had the smallest amount of flower length. Comparison of mean of flower dry weight showed that the Pol-e zangholeh population of *T. farfara* had the highest value while the population of Nur had the smallest amount. Pol-e zangholeh population of *T. farfara*, considered as superior populations and its flowering time were earlier than the others. It was found that there is a significant difference ($p \leq 0.01$) between different populations. This variation may be due to Population differences of People, either due to differences in environmental conditions or sometimes due to the interaction of the population and the environment. Our results also indicate the presence of comparable genetic potentials of *T. farfara* in these population for any further cultivar development. Analysis variance showed that there was significant difference between populations for total phenol, flavonoid and antioxidant activity ($p \leq 0.01$) and the Nur population had the highest total phenolic content and highest antioxidant activity. Comparison of antioxidant activity of different extracts from leaves and flowers of *T. farfara* showed that the most antioxidant activity was related to leaf extract of Nur population with IC₅₀ 271 µg/ml closer to BHT (33 µg/ml) as a synthetic and

1, 2 and 3- Ph.D. Student of Horticultural Sciences and Assistant Professors, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: m.ayyari@modares.ac.ir)

industrial antioxidant. The least amount of this activity was related to Kaleybar leaf extract with IC₅₀ 888 µg/ml. Nur population showed the highest total phenol content with 242 mg GAE/g dried weight. Damavand population showed the highest total flavonoid content with 40 mg QE/g DW extract.

Conclusion: Our results indicate the presence of comparable potentials of *T. farfara* in these populations for any further cultivar development. Study of antioxidant activity in different habitats shows that Nur habitat is a suitable place for the cultivation of *T. farfara* to increase the amount of phenolic compounds and antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity, Coltsfoot, Morphological study, Phytochemical studies, Total flavonoid



تأثیر تنش‌های خشکی و شوری بر رشد، گلدهی و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نرگس (*Narcissus tazetta* L.)

علی ناصری مقدم¹ - حسن بیات^{2*} - محمد حسین امینی فرد³ - فرید مرادی نژاد⁴

تاریخ دریافت: 1397/09/14

تاریخ پذیرش: 1398/04/05

چکیده

در بین تنش‌های محیطی، خشکی و شوری جزء مهم‌ترین تنش‌ها هستند که رشد و نمو گیاهان را در مناطق خشک و نیمه خشک محدود می‌کنند. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تنش‌های خشکی و شوری بر صفات‌های رویشی، زایشی و بیوشیمیایی گل نرگس شهبلا (*Narcissus tazetta* L.) بود. این آزمایش گلخانه‌ای، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند در سال 1396 انجام شد. تیمارها شامل کلرید سدیم در چهار سطح صفر (شاهد)، 20، 40 و 60 میلی‌مولار و تنش خشکی در چهار سطح ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی بودند. نتایج اثرهای ساده نشان داد که تنش‌های خشکی و شوری باعث کاهش مقدار قطر ساقه گل‌دهنده، قطر گل، طول ریشه، حجم ریشه، وزن تر ریشه، طول و وزن تر سوخ، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک کل و تعداد روز از گلدهی تا پیری گل شدند. در مقابل صفات‌های تعداد روز از کاشت تا گلدهی، میزان قندهای محلول کل برگ و ریشه، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی و محتوای فنول کل تحت تأثیر این دو تنش افزایش یافتند. نتایج اثرهای متقابل نشان داد که اثر مخرب تنش‌های شوری و خشکی در شرایط کاربرد توأم دو تنش، تشدید شد به طوری که کمترین مقدار صفات‌های رشدی و زایشی در شدیدترین سطح تنش (30 درصد ظرفیت زراعی × شوری 60 میلی‌مولار) مشاهده شد. به طور کلی، نتایج نشان داد که در محدوده تیمارهای اعمال شده، اثر مخرب تنش شوری بر صفات‌های رشدی، زینتی و فیزیولوژیکی گل نرگس بیشتر از تنش خشکی بود.

واژه‌های کلیدی: حجم ریشه، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی، قطر گل، قندهای محلول کل، محتوای فنول کل

مقدمه

خشکی و شوری به چربی‌ها، پروتئین‌ها و حتی نوکلئیک اسیدهای سلولی حمله کرده و بدین ترتیب در اولین مرحله، تراوایی غشای سلولی مختل می‌گردد (62). در مواقعی که شوری باعث می‌شود آب در اختیار گیاه قرار نگیرد، تنش خشکی نیز در گیاه ایجاد می‌شود (24). خشکی نیز یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان در سرتاسر جهان و شایع‌ترین تنش محیطی است (1). برای انجام عمل فتوسنتز، تبادلات گازی ضروری است. در اثر کمبود آب، روزنه‌ها بسته شده و تبادلات گازی کاهش یافته، در نتیجه دی‌اکسید کربن کمتری در دسترس گیاه قرار می‌گیرد و فتوسنتز کاهش می‌یابد (64). تنش خشکی و شوری باعث کاهش تقسیم سلولی و همچنین کوچکتر شدن اندازه سلول‌ها شده و در نتیجه رشد گیاه کاهش می‌یابد (48 و 52).

گیاهان برای تطابق با شرایط تنش خشکی از مکانیسم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده می‌کنند (28). یکی از راهکارهای مقابله با تنش‌های خشکی و شوری، افزایش تولید ترکیب‌های محلول سازگار⁶ می‌باشد. در این فرایند که به آن تنظیم

بیش از 6/1 میلیارد هکتار معادل 47/2 درصد از سطح کره زمین را مناطق خشک و نیمه‌خشک تشکیل می‌دهند (37). بنابر آمار بیش از 7 درصد اراضی کل زمین و 25 تا 50 درصد از نواحی قابل آبیاری آن با مشکل شوری روبرو می‌باشند (68). رشد بسیاری از گیاهان در محیط‌های شور به دلیل تنش اسمزی، تجمع یون‌های سمی نظیر سدیم و کلر در بافت‌های گیاهی و همچنین اختلال در جذب عناصر غذایی کاهش می‌یابد. تجمع این یون‌های سمی سبب کاهش فعالیت‌های آنزیمی، تغییر الگوی توزیع کربوهیدرات‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌گردد (20). تنش شوری می‌تواند با کاهش پتانسیل آب و پسابدگی⁵ بر مرفولوژی و فیزیولوژی گیاه تأثیرگذار باشد. در واقع رادیکال‌های آزاد تولید شده در اثر تنش‌های

1، 2 و 3 - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
(*) - نویسنده مسئول: (Email: hassanbayat@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.76772

5 - Dehydration

6- Compatible solute

مناطق گرمسیری رشد می کنند. نرگس شهلا⁸ گیاهی سوخدار و چندساله است که از آن به عنوان گل بریده، باغچه‌ای و گلدانی استفاده می شود (35). این گونه بومی فرانسه، پرتغال، اسپانیا و نواحی مدیترانه‌ای بوده و در مناطق مختلف ایران به خصوص شمال، شمال شرق، فارس، بوشهر، بهبهان، کرمان و خراسان جنوبی رویش دارد و زمان گلدهی آن پاییز و زمستان است (43). این گیاه زینتی به جهت دارا بودن خواص دارویی بسیار مورد توجه است (61). به عنوان مثال گل‌ها و سوخ‌های آن در درمان تب دورهای و اسهال خونی و ریشه‌های آن در درمان آبسه، جوش‌ها و بیماری‌های پوستی استفاده می شود (31). لکتین‌های جدا شده از این گیاه نیز فعالیت ضد HIV-1 از خود نشان می دهند (61). از طرف دیگر عطر گل‌های نرگس ارزش بالایی در صنایع عطر سازی دارد (65). با توجه به اینکه گیاه نرگس یکی از محصول‌های مهم اقتصادی ایران می باشد و از طرف دیگر بحران خشکسالی و شوری آب و خاک از مشکل‌های جدی بخش تولید در کشاورزی است، آگاهی از میزان تحمل این گیاه به تنش‌های خشکی و شوری به منظور تولید بهینه محصول، امری لازم و ضروری است. با توجه به بررسی‌های انجام شده تاکنون تحقیق جامع و کاملی در زمینه تأثیر تنش‌های خشکی و شوری بر گیاه نرگس شهلا گزارش نشده است. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر توأم تنش‌های خشکی و شوری بر خصوصیت‌های رشدی، گلدهی و بیوشیمیایی گل نرگس انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در اوایل شهریور سال 1396 در پردیس دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند واقع در کیلومتر 5 جاده بیرجند-کرمان با عرض جغرافیایی 32° و 56° شمالی، طول جغرافیایی 59° و 13° شرقی و ارتفاع 1480 متر از سطح دریا انجام شد. بعد از خریداری سوخ‌های نرگس شهلا از شهرستان خوسف، جداسازی سوخ‌های هم-اندازه با قطر حدود 5 سانتی متر و وزن تقریبی 25 گرم انجام شد و کشت سوخ‌ها در 20 شهریور ماه انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول تنش خشکی در چهار سطح ۷۰، ۵۰، ۳۰ و ۹۰ (شاهد) درصد ظرفیت زراعی (FC) و فاکتور دوم کلرید سدیم (NaCl) (مرک آلمان با خلوص 99 درصد) در چهار سطح صفر (شاهد)، 20، 40 و 60 میلی مولار بودند که مقادیر نمک به آب آبیاری مورد استفاده در منطقه اضافه شدند. قبل از اجرای آزمایش، نمونه‌گیری از خاک برای تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن انجام گردید. همچنین مقدار pH و EC آب اندازه‌گیری شدند (جدول 1). گلدان‌های مورد استفاده برای

اسمزی¹ نیز گفته می شود، ترکیب‌هایی مانند قندها به ویژه قندهای الکلی، الیگوساکاریدها، گلیسرول، آمینواسیدها و سایر متابولیت‌های دارای وزن مولکولی پایین درون سلول انباشته می شوند. این ترکیب‌ها در مقادیر بالا برای سلول‌ها غیرسمی بوده و به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی بین سیتوپلاسم و واکوئل عمل کرده و به جلوگیری از اتلاف آب از سلول کمک می کنند (34). یکی از این ترکیب‌ها، قندها می باشند که به عنوان بهبود دهنده سیستم ایمنی عمل می کنند و قادرند پاسخ‌های ایمنی را در گیاه افزایش دهند (39). افزایش فعالیت‌های آنتی اکسیدانی یکی دیگر از فرآیندهای متابولیسمی ابتدایی است که باعث افزایش تحمل به تنش خشکی و شوری در گیاهان می شود. این تنش‌ها سبب تولید ترکیب‌های با اکسیژن فعال² (ROS) می شود که این ترکیب‌ها به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه می زنند. گیاهان برای پاکسازی و سمیت زدایی ترکیب‌های ROS از سطح سلول، از سیستم‌های دفاعی آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ...) و غیر آنزیمی (مانند ترکیب‌های فنولی و کارتنوئیدها) استفاده می کنند (66). در سیستم‌های غیر آنزیمی، ترکیب‌های فنولی نقش اساسی را ایفا می کنند. ترکیب‌های فنولی طی رشد و نمو، با هدایت عوامل ژنتیکی و در پاسخ به محرک‌های محیطی ساخته می شوند که از میان آنها می توان به لیگنین‌ها، لیگنان‌ها، فنول‌های ساده و اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها اشاره کرد که امروزه با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی قوی و ضدسرطانی بسیار مورد توجه است (21).

در آزمایشی مشخص شد که گل و پدازه زعفران³ به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را به کمبود آب خاک دارند (52). واتچ بلهوم و همکاران (67) گزارش کردند که تنش شوری باعث کاهش وزن خشک سوخ و اندام هوایی ارقام گل نرگس دافودایل شد. گزارش شده است که دو گونه سوخدار هیپوستروم⁴ و اورنیتوگالوم⁵ بسیار حساس به شوری هستند و با افزایش سطوح شوری وزن تمام اندام‌های این گیاهان کاهش یافت (57). همچنین بهادران و صالحی (6) گزارش کردند که تنش‌های شوری و خشکی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی و قطر شاخه گل دهنده گیاه مریم شدند. گل نرگس⁶ از خانواده نرگسیان⁷ می باشد که یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی و دارویی است که گونه‌های مختلف آن در سرتاسر دنیا به جز

1- Osmotic adjustment

2- Reactive oxygen species

3- *Crocus sativus* L.

4- *Hippeastrum* × *hybridum* Hort

5- *Ornithogalum arabicum* L.

6- *Narcissus* spp.

7- Amaryllidaceae

8- *Narcissus tazetta* L. cv. 'Shahla'

وضعیت رطوبتی تمامی گلدان‌ها به وسیله وزن کردن روزانه آن‌ها در ساعت 9 صبح مشخص گردید. نقصان رطوبتی گلدان‌های شاهد و خشکی (بدون تیمار شوری) با اضافه نمودن مقدار آب لازم (شاهد) و رساندن به حد ظرفیت زراعی در تیمارهای مورد نظر جبران شد. برای اعمال تنش خشکی و شوری سایر گلدان‌ها، متناسب با تیمار مورد نظر، از آب شور جهت اعمال تنش‌های خشکی و شوری مربوطه استفاده شد. هدایت الکتریکی آب آبیاری حاوی کلرید سدیم با غلظت‌های صفر، 20، 40 و 60 میلی‌مولار به ترتیب 1/1، 3/25، 5/40 و 7/98 دسی‌زیمنس بر متر بود.

اجرای آزمایش پلاستیکی بوده و قطر دهانه و ارتفاع آن به ترتیب 23 و 25 سانتی‌متر بودند. برای ضدعفونی و جلوگیری از شیوع بیماری‌های قارچی، ابتدا سوخ‌ها به مدت 30 ثانیه در قارچ‌کش بنومیل با غلظت 2 در هزار غوطه‌ور گردید و سپس در عمق 10 سانتی‌متری خاک کشت و بلافاصله آبیاری شدند. گیاهان طی دوره رشد اولیه و استقرار (به مدت 4 هفته) با آب شاهد و به تعداد دفعات دو بار در هفته آبیاری شدند. قبل از شروع اعمال تیمارهای خشکی و شوری، گلدان‌ها با کود کامل NPK (20-20-20) و با غلظت 2 در هزار تغذیه شدند. تنش خشکی بر حسب ظرفیت زراعی خاک گلدان‌ها اعمال گردید. ظرفیت زراعی خاک آزمایش 20 درصد به دست آمد.

جدول 1- مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک و آب استفاده شده در آزمایش
Table 1- Physiochemical characteristics of soil and water used in this experiment

خاک Soil							آب Water			
بافت Texture	سیلت Silt %	رس Clay %	شن Sand %	FC %	pH	هدایت الکتریکی EC ds/m	سدیم Na meq/L	هدایت الکتریکی EC ds/m	pH	سدیم Na meq/L
لومی شنی Sandy loam	29	28	43	20	8.1	1.94	11.0	1.1	7.79	5.6

قندهای محلول کل با روش آنترون¹ ارزیابی شد (38). بدین منظور، 0/2 میلی‌لیتر از عصاره غلیظ شده، با 3 میلی‌لیتر معرف آنترون (150 میلی‌گرم آنترون در 100 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 13 مولار) مخلوط شد و به مدت 20 دقیقه در حمام آب گرم با دمای 100 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب هر یک از آن‌ها در طول موج 620 نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر (Model Unico 2100, China) اندازه‌گیری شد. میزان قندهای محلول کل با منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد.

سنجش محتوای فنول کل با معرف فولین سیکالتو² و به روش سینگلتون و همکاران انجام شد (58). به طور خلاصه، 0/05 گرم از بافت تازه برگ گیاه در 2 میلی‌لیتر متانول 80 درصد ساییده و همگن شد و سپس در بن‌ماری در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه قرار گرفت؛ سپس با سرعت 5000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. به 1 میلی‌لیتر از محلول متانولی رویی، 1/8 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/2 میلی‌لیتر معرف فولین اضافه و محلول به مدت 5 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس 1 میلی‌لیتر سدیم کربنات 12 درصد به محلول فوق اضافه شد. پس از

صفت‌های اندازه‌گیری شده

اعمال تیمارهای خشکی و شوری حدود 4 ماه به طول انجامید و سپس صفت‌های مورد نظر اندازه‌گیری شدند. صفت‌های رویشی مورد بررسی شامل طول، حجم و وزن تر ریشه، طول و وزن تر سوخ، وزن تر اندام هوایی و وزن خشک کل، صفت‌های زایشی شامل قطر گل و تاج گل، قطر ساقه گل‌دهنده، تعداد روز از کاشت تا گلدهی و تعداد روز از گلدهی تا پیری گل و صفت‌های بیوشیمیایی نیز شامل فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی، محتوای فنول کل و قندهای محلول کل برگ و ریشه بودند. صفت‌های تعداد روز از کاشت تا گلدهی (باز شدن اولین گل روی ساقه گل‌دهنده) و تعداد روز از گلدهی تا پیری گل (پیر شدن اولین گل روی ساقه گل‌دهنده) بر حسب تعداد روز محاسبه شدند. طول ریشه با خط‌کش و صفت‌های طول سوخ، قطر گل، قطر تاج گل و قطر ساقه با کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شدند. حجم ریشه به وسیله استوانه آب و بر اساس قانون ارشمیدس اندازه‌گیری و محاسبه شد. وزن تر ریشه، سوخ و اندام هوایی با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شدند. برای تعیین وزن خشک کل، نمونه‌ها در آون با دمای 78 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت قرار داده شدند و سپس توزین شدند (59).

1- Anthrone

2- Folin-Ciocalteu

2 ساعت قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه، جذب محلول حاصل در طول موج 765 نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. غلظت فنول بر اساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر بیان شد و از گالیک اسید برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از سنجش خنثی سازی رادیکال آزاد DPPH (2 و 2- دی فنیل 1- پیکریل هیدرازیل) ارزیابی شد (33). برای این منظور 50 میکرولیتر عصاره به همراه 950 میکرولیتر محلول DPPH 0/1 نرمال در متانول، درون میکروتیوپ ریخته شد. سپس میکروتیوپها به خوبی تکان داده شدند و به مدت 30 دقیقه در یک محیط تاریک در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس جذب شاهد و نمونه‌ها در طول موج 517 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و با قراردادن جذب مربوط به شاهد و نمونه در فرمول 1، درصد خنثی سازی رادیکال آزاد محاسبه شد.

فرمول 1 $100 \times (\text{جذب قرائت شده} / \text{جذب نمونه شاهد}) - 1 =$ فعالیت آنتی اکسیدانی

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 صورت گرفت. برای رسم شکل‌ها از نرم افزار Excel استفاده شد. میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

صفت‌های رویشی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده تنش‌های خشکی و شوری و اثر متقابل آن‌ها بر طول ریشه معنی دار بود (جدول 2). کاهش طول ریشه در تیمار خشکی (کمتر از 90 درصد ظرفیت زراعی) و در تیمار شوری (بیشتر از 1/1 دسی زیمنس بر متر) مشاهده شد، به طوری که شدیدترین تیمارهای خشکی و شوری طول ریشه را به ترتیب 24 و 27 درصد نسبت به شاهد کاهش دادند (جدول 3). همچنین نتایج اثر متقابل شوری و خشکی نشان داد که کمترین طول ریشه از شدیدترین سطوح تنش شوری و خشکی (60 میلی مولار $\times$ 30 درصد ظرفیت زراعی) با 51 درصد کاهش در مقایسه با شاهد به دست آمد (جدول 4). نتایج حاصل از آزمایش دی و کار (13) نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی طول ریشه گیاه لوبیا کاهش یافت. نتایج به دست آمده از آزمایش اثر تنش خشکی روی گوجه فرنگی نشان داد که آبیاری کم باعث کاهش طول ریشه شد (14). طول ریشه به عنوان شاخصی از توانایی گیاه به جذب آب از لایه‌های عمیق تر خاک می باشد (19). به طور معمول کاهش طول ریشه و ساقه در محلول کلرید سدیم به دلیل سمیت یون‌ها و اثر منفی آن‌ها بر غشای سلول است (50). تنش خشکی و شوری باعث کاهش تقسیم سلولی و همچنین کوچک تر شدن اندازه سلول‌ها شده و در نتیجه طول ریشه

کاهش می یابد (48 و 53). به نظر می رسد که فرآیند تولید شدن نسبت به تقسیم سلول‌ها، بیشتر تحت تأثیر تنش خشکی قرار می گیرد که علت آن نیروی پسابیدگی و معکوس پتانسیل بر جذب آب سلول است (45 و 55). در صفت وزن تر ریشه هر یک از اثرات ساده تنش‌های خشکی و شوری و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر وزن تر ریشه معنی دار شده و کاهش بود (جدول 2). کمترین وزن تر ریشه در تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی با 74 درصد کاهش نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول 3). در تنش شوری، کمترین وزن تر ریشه در شوری 60 میلی مولار با کاهش 45 درصدی مشاهده گردید (جدول 3). اثر متقابل تنش‌ها روی صفت وزن تر ریشه نشان داد که کمترین عملکرد در تنش شوری 60 میلی مولار $\times$ 30 درصد ظرفیت زراعی بود که باعث کاهش 82 درصدی آن شد (جدول 4). نتایج تحقیق تنش خشکی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی چهار رقم انجیر نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی وزن ریشه‌های انجیر کاهش یافت (12). اسکندری زنجانی و همکاران (16) نیز گزارش کردند که تنش شوری باعث کاهش وزن تر ریشه گیاه درمنه¹ شده است. نتایج به دست آمده از آزمایش اثر تنش خشکی روی صفت‌های ریشه سویا نشان داد که آبیاری کم بر وزن تر ریشه اثر معنی دار و کاهش داشت (56). کاهش رشد ریشه و ساقه در شرایط تنش شوری می تواند صدمات جبران ناپذیری به عملکرد نهایی گیاه وارد نماید (56). افزایش غلظت نمک در محیط ریشه باعث کاهش تعداد تارهای کشنده و چروکیدگی سطح آن‌ها می گردد که این چروکیدگی باعث کاهش طول ریشه و وزن ریشه می گردد (11 و 44). اثر تنش‌های اعمال شده بر صفت حجم ریشه در سطح 1 درصد معنی دار بود (جدول 2). کاهش حجم ریشه در تیمار خشکی کمتر از 90 درصد ظرفیت زراعی و در تیمار شوری بیشتر از 1/1 دسی زیمنس بر متر مشاهده شد، به طوری که از 13/79 سانتی متر مکعب در شاهد به 7 سانتی متر مکعب در 30 درصد ظرفیت زراعی و در تنش شوری از 14/79 سانتی متر مکعب شاهد به 6/33 سانتی متر مکعب در 60 میلی مولار کاهش یافت (جدول 3). در اثر متقابل دو تنش، کمترین حجم ریشه از 30 درصد ظرفیت زراعی و شوری 60 میلی مولار به دست آمد (79 درصد کاهش نسبت به شاهد). نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج آزمایش انجام شده روی ذرت که اظهار داشتند تنش شوری سبب کاهش حجم ریشه می گردد، مطابقت داشت (10). همچنین در پژوهشی تأثیر تنش خشکی بر رشد ریشه، عملکرد و اجزای عملکرد گوجه فرنگی در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد که مشخص گردید کمترین حجم ریشه از سطح 40 درصد نیاز آبی به دست آمد (14).

جدول ۲- آنالیز واریانس صفات رویشی، زایشی و بیوشیمیایی گیاه نرگس تحت تأثیر تنش‌های خشکی و شوری
Table 2- Analysis of variance for vegetative, reproductive and biochemical traits of *Narcissus tazetta* L. affected by drought and salinity stresses

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	طول ریشه Root length	حجم ریشه Volume of root	وزن تر ریشه Root fresh weight	طول سبزه Bulb length	وزن تر سبزه Bulb fresh weight	وزن تر اندام هوائی Shoot fresh weight	وزن خشک کل Total dry weight	قطر گل Flower diameter	قطر تاج گل Flower crown diameter
خشکی Drought	3	88.13**	104.59**	139.98**	31.90**	193.55**	92.02**	21.81**	0.68**	0.17 ^{ns}
شوری Salinity	3	118.95**	152.03**	70.64**	19.29**	81.65**	163.38**	15.21**	0.96**	0.11**
شوری×خشکی drought×Salinity	9	10.51**	44.01**	23.50**	7.53**	13.96*	3.55*	3.81*	0.15**	0.016 ^{ns}
خطا Error	30	2.65	1.75	1.68	1.04	5.33	1.27	1.56	0.16	0.016
CV (%)		7.07	13.38	14.50	2.83	7.42	10.38	12.12	3.35	11.73

Continue table2

ادامه جدول ۲

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	قطر ساقه گل دهنده Flowering stem diameter	تعداد روز از کاشت تا گلدهی Days from planting to flowering	تعداد روز از گلدهی تا پیری گل Days from flowering to senescence	فعالیت اکسیدانی Antioxidant activity	کل محتوای فنول Total phenol content	تعداد محلول قند برگ Total soluble sugar of leaf	کل ریشه محلول تعداد محلول قند ریشه Total soluble sugar of root	تعداد روز از گلدهی تا پیری گل Days from flowering to senescence
خشکی Drought	3	0.36**	435.63**	85.50**	537.36**	9.47**	248.8**	1.62**	85.50**
شوری Salinity	3	0.36**	1418.91**	36.27**	778.27**	16.09**	185.35**	15.6**	36.27**
شوری×خشکی Salinity × drought	9	0.07**	89.22**	22.51**	68.33**	0.69 ^{ns}	32.39**	1.55**	22.51**
خطا Error	30	0.016	14.47	2.82	7.90	0.67	2.81	0.22	2.82
CV (%)		10.13	3.60	12.30	4.21	17.83	15.18	28.43	12.30

ns، **، ***: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و بدون اختلاف معنی‌دار.

ns: significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ and non-significant respectively. **, ***, *.

اثر ساده و همچنین اثر متقابل تنش‌ها بر قطر ساقه گل‌دهنده در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود، به طوری که بین شاهد و کمترین قطر ساقه که متعلق به شوری 60 میلی‌مولار $\times 30$ درصد ظرفیت زراعی بود اختلاف 47 درصدی وجود داشت، اما اختلاف معناداری در قطر ساقه بین شاهد و شوری 20 میلی‌مولار $\times 90$ درصد ظرفیت زراعی وجود نداشت (جدول 4). شیلو و همکاران (57) گزارش کردند که در گیاه لیمونیوم¹ قطر ساقه گل‌دهنده و قطر گل تحت سطوح مختلف شوری کاهش یافت. همچنین بهادران و صالحی (6) نیز اظهار داشتند که تنش‌های شوری و خشکی باعث کاهش قطر ساقه گل‌دهنده گل مریم شدند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. در پژوهش دیگری مشخص گردید که خشکی باعث کاهش قطر ساقه چای ترش می‌گردد (49). قطر ساقه تحت تأثیر تقسیم و بزرگ شدن سلولی در شرایط تنش کمبود آب قرار می‌گیرد. این مسئله احتمالاً نتیجه اختلال در فتوسنتز، تعرق، فرایندهای متابولیکی گیاه و غیره است (51). مقایسه میانگین اثر ساده تنش‌های اعمال شده نشان داد که با افزایش سطح هر یک از تنش‌های شوری و خشکی از طول سوخ نرگس کاسته شد (جدول 3)، به طوری که شدیدترین تیمارهای خشکی و شوری طول سوخ را به ترتیب 9/6 و 7/1 درصد نسبت به شاهد کاهش دادند (جدول 3). همچنین نتایج اثر متقابل تیمار شوری و خشکی نشان داد که کمترین طول سوخ در شدیدترین سطوح تنش شوری و خشکی (60 میلی‌مولار $\times 30$ درصد ظرفیت زراعی) با 20/6 درصد کاهش در مقایسه با شاهد به دست آمد (جدول 4). بیدشکی و آروین (8) گزارش کردند که تنش خشکی قطر و طول سوخ گیاه سیر را به ترتیب 25 و 21 درصد در مقایسه با شاهد کاهش داد. در صورت وزن تر سوخ، اثر ساده تنش‌های خشکی و شوری و اثر متقابل آن‌ها بر این صفت معنی‌دار بود (جدول 2). کاهش وزن تر سوخ در تیمار خشکی کمتر از 90 درصد ظرفیت زراعی و در تیمار شوری بیشتر از 1/1 دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (جدول 3). بیشترین کاهش وزن سوخ در اثر متقابل شدیدترین تنش‌های اعمال شده مشاهده گردید (جدول 4). رستمی و همکاران (47) گزارش کردند که با افزایش شدت تنش شوری میانگین وزن پدازه‌های زعفران به صورت معنی‌داری کاهش یافت. به نظر می‌رسد از آنجا که در شرایط تنش شوری شدید وزن پدازه‌ها کاهش یافته است، بنابراین گیاه فراورده‌های فتوسنتزی خود را به پدازه‌ها کمتر اختصاص داده است (47). در پژوهش دیگر نیز گزارش شده است که با افزایش شدت تنش شوری تا سطح 9 دسی‌زیمنس بر متر، وزن پدازه‌ها حدود 50 درصد در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت (22). وزن تر سوخ گل نرگس

دافودیل² تحت تأثیر شوری تا سطح 50 میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (67). پژوهشگران کاهش غلظت کربوهیدرات و نشاسته در پدازه‌ها را به کاهش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در فتوسنتز و همچنین مساعد نبودن شرایط محیطی برای فعالیت‌های متابولیکی مربوط به فتوسنتز در گیاه نسبت دادند (22). اثر ساده تنش‌های اعمال شده بر صفت وزن تر اندام هوایی در سطح 1 درصد و اثر متقابل تنش شوری و خشکی در سطح 5 درصد معنی‌دار بود (جدول 2) به‌طوری‌که در شرایط تنش خشکی، مقدار این صفت از 14/62 گرم شاهد به 8/36 گرم در 30 درصد ظرفیت زراعی و در تنش شوری از 14/86 گرم شاهد به 5/96 گرم در 60 میلی‌مولار کاهش یافت (جدول 3). در اثر متقابل دو تنش، کمترین وزن تر اندام هوایی از تیمار 30 درصد ظرفیت زراعی و شوری 60 میلی‌مولار (84 درصد کاهش نسبت به شاهد) به دست آمد (جدول 4). اثر ساده تنش‌ها بر وزن خشک کل در سطح احتمال 1 درصد و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار بود (جدول 2). تنش‌های خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی و شوری 60 میلی‌مولار کلرید سدیم، وزن خشک کل را به ترتیب 23 و 22 درصد نسبت به شاهد کاهش دادند (جدول 3). کاهش وزن خشک کل در خشکی کمتر از 70 درصد ظرفیت زراعی و شوری بیشتر از 1/1 دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد و تا این محدوده میزان عملکرد خود را حفظ کرد (جدول 4). مفتاح و آل حمید (4) گزارش کردند که بیوماس گیاه و عملکرد گل مریم³ به‌طور معنی‌داری به وسیله کاهش تعداد دفعات آبیاری (کم آبیاری یا تنش خشکی) کاهش یافت. همچنین اثر تنش خشکی بر میزان وزن تر اندام هوایی گیاه کاسنی معنی‌دار بود و باعث کاهش آن شد (40). در بررسی تأثیر تنش خشکی روی چغندر قند کاهش وزن خشک کل گزارش شده است (7). تنش شوری بر وزن خشک کل برنج اثر گذاشت و وزن آن را کاهش داد که میزان کاهش در شوری 12 دسی‌زیمنس بر متر نسبت به شاهد 15 درصد بود (18). جیمز و همکاران (25) و بیسول‌بیتیگ و همکاران (9) نیز دریافتند که خشکی باعث کاهش وزن خشک گیاهان شبدر سفید و فلفل می‌گردد. تنش شوری از طریق کاهش فتوسنتز، تخریب غشاهای سلولی، کاهش آب قابل دسترس برای گیاه و تجمع یون سدیم سبب کاهش وزن گیاه می‌شود (12 و 54).

2- *Narcissus* sp.
3- *Polianthes tuberosa* L.

1- *Limonium* spp.

جدول ۳- اثر ساده تنش‌های خشکی و شوری بر صفات رویشی، زایشی و بیوشیمیایی گیاه نرگس

Table 3- Simple effects of drought and salinity stresses on vegetative, reproductive and biochemical traits of <i>Narcissus tazetta</i> L.										
تیمارها Treatments	طول ریشه Root length (cm)	حجم ریشه Volume of root (cm ³)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	طول سبوح Bulb length (mm)	وزن تر سبوح Bulb fresh weight (g)	وزن تر اندام هوایی Shoot fresh weight (g)	وزن خشک کل Total dry weight (g)	قطر گل Flower diameter (cm)	قطر تاج گل Flower crown diameter (cm)	
خشکی Drought (% FC)										
90	26.66 ^a	13.79 ^a	19.98 ^a	37.91 ^a	35.67 ^a	14.62 ^a	11.46 ^a	2.56 ^a	1.12 ^a	
70	23.04 ^b	10.41 ^b	10.28 ^b	36.83 ^b	32.71 ^b	11.20 ^b	11.41 ^a	2.21 ^b	1.10 ^a	
50	22.25 ^b	8.37 ^c	7.32 ^c	35.25 ^c	29.62 ^c	9.29 ^c	9.64 ^b	2.12 ^c	1.07 ^a	
30	20.16 ^c	7.00 ^d	5.16 ^c	34.25 ^d	26.33 ^d	8.36 ^c	8.74 ^b	2.00 ^d	1.03 ^a	
شوری Salinity (mM)										
شاهد Control	27.33 ^a	14.79 ^a	12.40 ^a	37.33 ^a	34.67 ^a	14.86 ^a	11.75 ^a	2.56 ^a	1.22 ^a	
20	22.79 ^b	9.70 ^b	8.28 ^b	36.91 ^a	31.31 ^b	11.75 ^b	10.48 ^b	2.34 ^b	1.06 ^b	
40	22.20 ^b	8.75 ^b	8.33 ^b	35.33 ^b	29.53 ^{bc}	10.90 ^b	9.98 ^{bc}	2.01 ^c	1.02 ^b	
60	19.79 ^c	6.33 ^c	6.74 ^c	34.66 ^b	28.82 ^c	5.96 ^c	9.05 ^c	1.97 ^c	1.02 ^b	

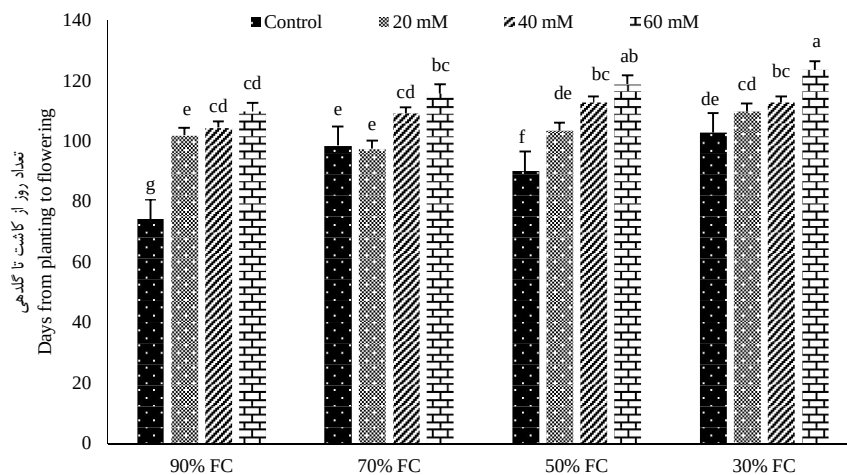
Continued table 3										
تیمارها Treatments	قطر ساقه گل دهنده Flowering stem diameter (cm)	تعداد روز تا گلدهی Days from planting to flowering	تعداد روز از گلدهی تا پیری Days from flowering to senescence	فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity (%)	محتوای فنول کل Total phenol content (mg/g FW)	قندهای محلول کل Total soluble sugar of leaf (mg/g DW)	قند های محلول کل ریشه Total soluble sugar of root (mg/g DW)			
خشکی Drought (% FC)										
90	1.48 ^a	97.75 ^c	16.16 ^a	58.18 ^c	3.44 ^c	8.01 ^c	1.46 ^b			
70	1.30 ^b	105.41 ^b	14.66 ^b	67.01 ^b	5.01 ^{ab}	8.30 ^c	1.54 ^b			
50	1.15 ^c	106.50 ^b	13.91 ^b	67.28 ^b	4.42 ^b	10.13 ^b	1.43 ^b			
30	1.09 ^c	112.41 ^a	9.91 ^c	74.54 ^a	5.50 ^a	17.72 ^a	2.20 ^a			
شوری Salinity (mM)										
شاهد Control	1.50 ^a	91.58 ^d	12.83 ^a	56.33 ^d	3.76 ^c	7.10 ^d	0.55 ^d			
20	1.26 ^b	103.33 ^c	13.75 ^b	64.76 ^c	3.61 ^c	8.90 ^c	1.07 ^c			
40	1.13 ^c	110.00 ^b	13.50 ^b	71.41 ^b	4.89 ^b	12.10 ^b	1.85 ^b			
60	1.12 ^c	117.16 ^a	11.58 ^c	74.52 ^a	6.10 ^a	16.05 ^a	3.17 ^a			

بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در هر ستون اعداد با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند.
According to Duncan's multiple range test, means in each column with similar letters are not significantly different at $P<0.05$.

صفت‌های زایشی

نتایج نشان داد که با افزایش سطوح هر یک از تنش‌های شوری و خشکی از قطر گل کاسته شد به‌طوری‌که در شدیدترین تیمارهای خشکی و شوری، مقدار این صفت به ترتیب با 21 و 23 درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول 3). کمترین قطر گل از تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی × شوری 60 میلی‌مولار با کاهش 45 درصدی نسبت به شاهد به دست آمد (جدول 4). در صفت قطر تاج گل، فقط تأثیر تنش شوری در سطح 1 درصد معنی‌دار بود و تنش خشکی و اثر متقابل شوری و خشکی اثر معنی‌داری نداشتند (جدول 2). تمامی سطوح تنش شوری به جز شاهد اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند (جدول 3). بهادران و صالحی (6) اظهار داشتند که تنش‌های شوری و خشکی باعث کاهش قطر گل مریم شد. نتایج آزمایش روی بومادران نشان داد که با افزایش شوری، از میانگین قطر گل آذین کاسته شد (15). تنش‌های شوری و خشکی باعث کاهش تقسیم و طولی شدن سلول‌ها می‌گردند و از این طریق منجر به کاهش عملکرد می‌شود (29 و 62)، همچنین شوری از طریق اثر منفی بر جذب عناصر غذایی، به ویژه کلسیم، که در افزایش دیواره سلولی و افزایش قطر گل شرکت دارد، سبب کاهش قطر گل‌های باز شده می‌گردد (41). در خصوص صفت تعداد روز از کاشت تا گلدهی، نتایج نشان داد که با افزایش سطوح هر یک از تنش‌های شوری و

خشکی، فاصله زمانی از کاشت تا گلدهی افزایش یافت؛ به‌طوری‌که بیشترین مدت زمان تا گلدهی از تنش شوری 60 میلی‌مولار (27 درصد افزایش نسبت به شاهد) و تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی (15 درصد افزایش نسبت به شاهد) به دست آمد (جدول 3). در اثر متقابل این دو تنش، بیشترین تعداد روز تا گلدهی در سطح شوری 60 میلی‌مولار × خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی و کوتاه‌ترین زمان تا گلدهی در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل 1). در اثر ساده تنش‌ها، کمترین تعداد روز از گلدهی تا پیری گل در شدیدترین سطح تنش‌های شوری و خشکی مشاهده شد (جدول 3). تعداد روز از گلدهی تا پیری گل در گیاهان شاهد 15 روز بیشتر از تیمار 30 درصد ظرفیت زراعی × شوری 60 میلی‌مولار بود (جدول 4). شوری به طور قابل توجهی زمان گلدهی و گلدهی موفقیت آمیز در گیاه نرگس رقم Actaea را تحت تأثیر قرار داد. گلدهی گیاهان در تیمار شاهد، 45 روز به طول انجامید، درحالی‌که در تیمار 25 میلی‌مولار، تعداد روز تا گلدهی 58 روز بود (67). در گیاه نرگس رقم‌های 'Dutch Master' و 'Ice Follies' تیمار شوری 150 میلی‌مولار کلرید سدیم باعث تأخیر گل‌آغازی شده و دوره گل‌دهی را به ترتیب 40 تا 70 درصد کاهش یافت (67). تأخیر در گلدهی به علت تنش‌های چندگانه (عدم تعادل اسمزی، کمبود مواد غذایی و سمیت سلولی) است که به وسیله تنش‌های شوری و خشکی اتفاق می‌افتد (60).



شکل 1- اثر متقابل شوری × خشکی بر تعداد روز از کاشت تا گلدهی گیاه نرگس

Figure 1- The interaction effects of drought × salinity stresses on days from planting to flowering of *Narcissus tazetta* L.

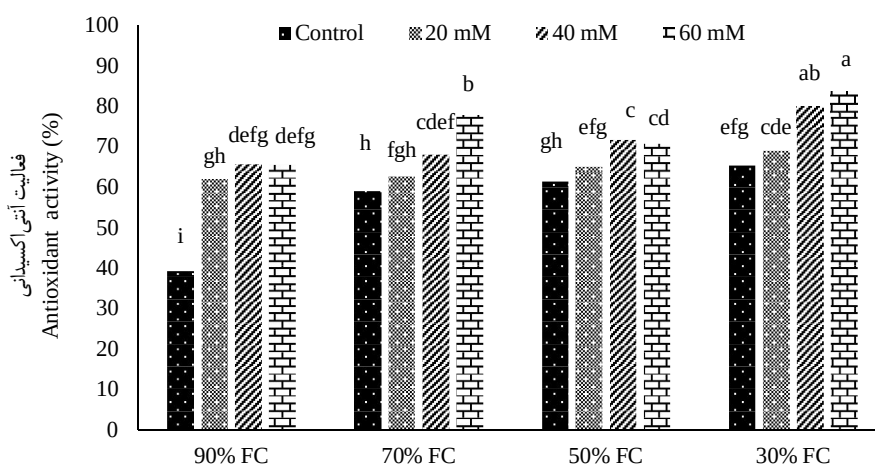
محتوای فنول کل

سطح هر یک از تنش‌های شوری و خشکی، میزان فنول گیاه افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان فنول از تنش شوری 60 میلی‌مولار

مقایسه میانگین‌های اثر ساده تیمارها نشان داد که با افزایش

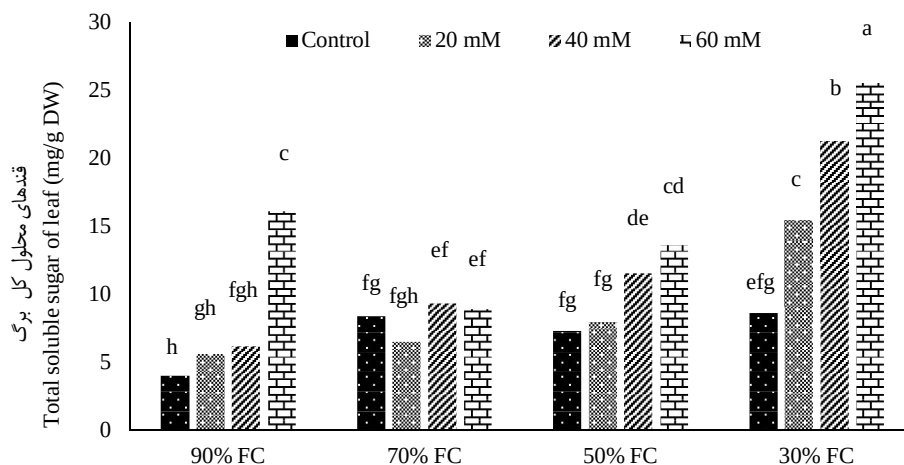
مربوط به خواص اکسیداسیون احیاء آن‌ها است که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند (5 و 26). با توجه به نقش آنتی-اکسیدانی ترکیب‌های فنولی در گیاه، به نظر می رسد افزایش این متابولیت‌ها در گیاه تحت شرایط تنش شوری و خشکی، سبب افزایش مقاومت آن در برابر عوامل نامساعد محیطی شده است (17، 30 و 46).

62 درصد افزایش نسبت به شاهد) و تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی (59 درصد افزایش نسبت به شاهد) به دست آمد (جدول 3). اثر متقابل این دو تنش بر فنول کل معنادار نبود (جدول 4). طبق تحقیق‌های قربانعلی و همکاران (23) اثر تنش خشکی بر گیاه سویا سبب افزایش معنی‌دار ترکیب‌های فنولی برگ شد. در تحقیقی دیگر، اثر سطوح مختلف شوری بر گیاه بادام‌زمینی نشان داد که شوری باعث افزایش میزان فنول گیاه شد (2). نقش ترکیب‌های فنولی



شکل 2- اثر متقابل شوری × خشکی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه نرگس

Figure 2- The interaction effects of drought × salinity stresses on leaf antioxidant activity of *Narcissus tazetta* L.



شکل 3- اثر متقابل شوری × خشکی بر میزان قندهای محلول کل برگ گیاه نرگس

Figure 3- The interaction effects of drought × salinity stresses on total soluble sugar of leaf of *Narcissus tazetta* L.

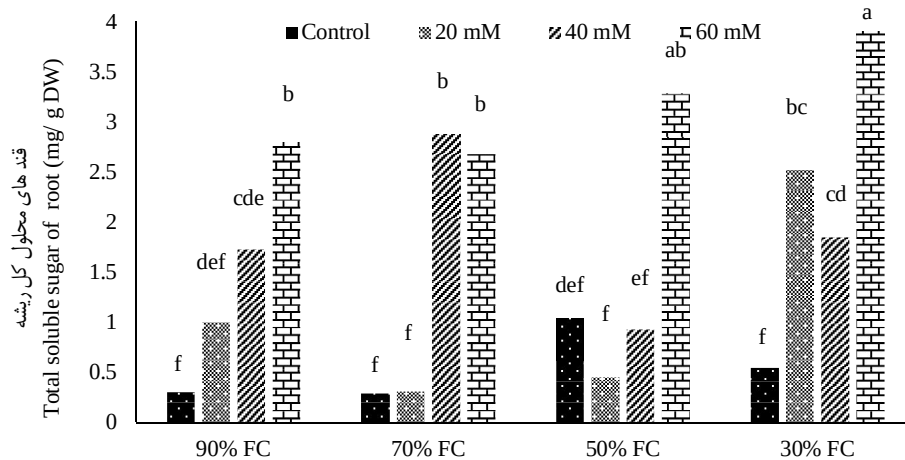
جدول ۴- اثر متقابل تنش های خشکی و شوری بر صفات رویشی، زایشی و بیوشیمیایی گل نرگس.

Table 4-The interaction effects of drought×salinity stresses on vegetative, reproductive and biochemical traits of *Narcissus tazetta* L.

تیمارها Treatments	طول ریشه Root length (cm)	حجم ریشه Volume of root (cm ³)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	طول سوخ Bulb length (mm)	وزن تر سوخ Bulb fresh weight (g)	وزن تر اندام Shoot fresh weight (g)	وزن خشک کل Total dry weight (g)	قطر گل Flower diameter (cm)	قطر تاج گل Flower crown diameter (cm)	قطر ساقه Stem diameter (cm)	تعداد روز از گلدهی تا پیری Days from flowering to senescence (day)	محتوای فنول کل Total phenolic content (mg/g FW)
شوری Salinity												
خشکی Drought												
90	35.00 ^a	26.00 ^a	21.62 ^a	42.00 ^a	43.24 ^a	20.21 ^a	14.18 ^a	3.32 ^a	1.18 ^a	1.76 ^a	23.33 ^a	2.10 ^a
70	26.33 ^b	16.33 ^b	15.04 ^b	39.00 ^b	35.83 ^b	14.85 ^b	14.16 ^a	2.39 ^c	1.13 ^a	1.40 ^b	16.01 ^{bc}	4.33 ^a
50	25.66 ^{bc}	9.66 ^d	7.59 ^{def}	34.33 ^{efg}	30.97 ^{cde}	12.66 ^{cde}	9.41 ^{bcd}	2.34 ^c	1.28 ^a	1.44 ^b	13.05 ^{cdef}	3.84 ^a
30	22.33 ^{def}	7.16 ^{defg}	5.37 ^{fg}	34.00 ^{fg}	28.63 ^{def}	11.73 ^{def}	9.24 ^{bcd}	2.21 ^d	1.31 ^a	1.38 ^b	11.11 ^{efg}	4.77 ^a
90	25.33 ^{bcd}	13.33 ^c	11.84 ^c	38.00 ^{bc}	35.21 ^{bc}	14.24 ^{bc}	11.61 ^b	2.81 ^b	1.14 ^a	1.54 ^{ab}	15.08 ^{bcd}	2.69 ^a
70	22.83 ^{cdef}	9.33 ^{de}	8.22 ^{de}	38.00 ^{bc}	32.25 ^{bcd}	11.56 ^{def}	10.41 ^{bcd}	2.35 ^c	1.11 ^a	1.35 ^b	15.12 ^{bcd}	3.98 ^a
50	22.00 ^{ef}	9.16 ^{def}	7.57 ^{def}	36.66 ^{cd}	30.53 ^{de}	11.11 ^{efg}	10.89 ^{bc}	2.21 ^d	1.06 ^a	1.10 ^c	15.00 ^{bcd}	2.94 ^a
30	21.00 ^{ef}	7.00 ^{efg}	5.49 ^{fg}	35.00 ^{defg}	27.26 ^{efg}	10.08 ^{fgh}	8.99 ^{cde}	2.02 ^{ef}	0.95 ^a	1.04 ^c	10.11 ^{fg}	4.85 ^a
90	24.00 ^{bcd}	8.33 ^{def}	9.69 ^{cd}	36.00 ^{de}	31.38 ^{cde}	13.42 ^{bcd}	10.25 ^{bcd}	2.09 ^{de}	1.10 ^a	1.51 ^b	13.66 ^{cde}	4.23 ^a
70	22.83 ^{cdef}	9.33 ^{de}	9.35 ^d	35.33 ^{def}	31.01 ^{cde}	12.25 ^{cde}	10.76 ^{bc}	2.08 ^{de}	0.98 ^a	1.00 ^c	12.13 ^{def}	4.96 ^a
50	21.66 ^{ef}	8.83 ^{def}	8.36 ^d	35.33 ^{def}	30.64 ^{de}	9.47 ^{gh}	9.98 ^{bcd}	1.97 ^{efg}	1.04 ^a	1.04 ^c	18.09 ^b	5.25 ^a
30	20.33 ^f	8.50 ^{def}	5.92 ^{ef}	34.66 ^{efg}	25.10 ^{gf}	8.46 ^h	8.92 ^{cde}	1.91 ^{fg}	0.97 ^a	0.99 ^c	10.33 ^{fg}	5.14 ^a
90	22.33 ^{def}	7.50 ^{defg}	8.79 ^d	35.66 ^{def}	32.86 ^{bcd}	10.63 ^{efg}	9.81 ^{bcd}	2.02 ^{ef}	1.07 ^a	1.10 ^c	12.66 ^{def}	4.76 ^a
70	20.16 ^f	6.66 ^{fg}	8.51 ^d	35.00 ^{defg}	31.74 ^{bcd}	6.12 ⁱ	10.30 ^{bcd}	2.00 ^{efg}	1.07 ^a	1.44 ^b	12.60 ^{def}	6.77 ^a
50	19.66 ^f	5.83 ^g	5.78 ^{fg}	34.66 ^{efg}	26.35 ^{fg}	3.91 ^j	8.28 ^{de}	1.98 ^{efg}	1.03 ^a	1.00 ^c	12.63 ^{def}	5.64 ^a
30	17.00 ^g	5.33 ^g	3.87 ^g	33.33 ^g	24.34 ^g	3.17 ^j	7.80 ^e	1.81 ^g	0.91 ^a	0.93 ^c	8.33 ^g	7.25 ^a

اعدادی که در هر ستون دارای حداقل یک حرف مشابه هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند.

Means in each column followed by similar letters are not significantly different at 0.05 probability level, using Duncan test.



شکل 4- اثر متقابل شوری × خشکی بر قندهای محلول کل ریشه گیاه نرگس
Figure 4- The interaction effects of drought × salinity stresses on total soluble sugar of root of *Narcissus tazetta* L.

شدیدترین تیمارهای خشکی و شوری قند برگ را به ترتیب 1/21 و 1/26 برابر نسبت به شاهد افزایش دادند (جدول 3). همچنین نتایج اثر متقابل شوری و خشکی نشان داد که بیشترین قند برگ از تیمار 60 میلی مولار × 30 درصد ظرفیت زراعی با 5 برابر افزایش در مقایسه با شاهد به دست آمد (شکل 3). همچنین بیشترین میزان قند ریشه در تنش شوری 60 میلی مولار و تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (جدول 3). در اثر متقابل تنش‌ها، قند ریشه تا سطح 50 درصد ظرفیت زراعی و شوری 20 میلی مولار افزایش معناداری نداشت (شکل 4). تجمع قندهای محلول کل به عنوان نتیجه‌ای از تنش شوری و خشکی در گلرنگ بهاره، پرتقال واشنگتون ناول و آلوئه‌ورا توسط سایر محققین گزارش شده است (27، 36 و 42). در پژوهشی که توسط سیلوا و همکاران (59) روی لوبیا چشم بلبلی انجام شد دریافتند که شوری باعث افزایش میزان قندهای محلول شد. همچنین با افزایش شدت تنش شوری میزان تجمع قندهای محلول در گیاه گلرنگ بهاره به طور معنی‌داری افزایش یافت (27). در بررسی تنش شوری روی زعفران، افزایش قند در شوری بالا گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (46). افزایش مقدار قندهای محلول به عنوان شاخصی برای تنظیم اسمزی در شرایط تنش می‌باشد. همچنین عمل فیزیولوژیک این قندها ممانعت از اتصال بین غشاهای مجاور هم در طول دوره تنش با نگهداری لیپیدها و پایداری پروتئین‌ها از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی با دنباله‌های خطی پروتئین‌ها، تنظیم ژن و تنظیم اسمزی می‌باشد (3).

فعالیت آن‌تی اکسیدانی

اثر تنش خشکی و شوری و اثر متقابل آن‌ها بر فعالیت آن‌تی-اکسیدانی برگ معنی‌دار بود (جدول 2). بیشترین فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی و شوری 60 میلی مولار و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد بود (جدول 3). بیشترین مقدار فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی در تیمار تنش خشکی 30 درصد ظرفیت زراعی × شوری 60 میلی مولار با افزایش 1/13 برابری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل 2). کلیمچاک و همکاران (32) بیان نمودند که تیمار شوری باعث افزایش فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. کافی و همکاران (28) نشان دادند که فعالیت آن‌تی اکسیدانی برگ ژنوتیپ‌های نخود در شرایط تنش شوری افزایش پیدا کرد. ولیفرد و همکاران (66) نیز نشان دادند که تنش شوری در گیاه مریم‌گلی سبب افزایش فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی گیاه شد. این تنش‌ها سبب تولید ترکیب‌های ROS می‌شوند که به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب می‌زنند. گیاهان برای پاکسازی و سمیت زدایی این ترکیب‌ها از سطح سلول، از سیستم‌های دفاعی آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ...) و غیرآنزیمی (مانند ترکیب‌های فنولی و کارتنوئیدها) استفاده می‌کنند که سبب افزایش فعالیت آن‌تی اکسیدانی گیاه می‌شود (66).

قندهای محلول کل

مقایسه میانگین اثر ساده تنش‌های اعمال شده نشان داد که با افزایش سطوح هر یک از تنش‌های شوری و خشکی، محتوای قند برگ و ریشه گیاهان افزایش یافت (جدول 3)، به طوری که

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنش‌های خشکی و شوری تأثیر مخربی بر صفتهای رشدی و گلدهی گل نرگس داشتند که در شرایط کاربرد توأم این دو تنش، این اثرها تشدید شد. از سوی دیگر بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول کل و قندهای محلول کل ریشه و برگ در شرایط تنش شدید خشکی یا شوری به دست آمد. تنش شوری و خشکی سرعت گلدهی و کیفیت گل‌ها را

کاهش داد و موجب کمتر شدن عمر گل روی بوته شد ولی نتایج نشان داد تمامی سطوح تنش به مرحله گلدهی رسیدند. همچنین رشد گیاه نرگس تحت تأثیر شدیدترین سطوح تنش خشکی (30 درصد ظرفیت زراعی) و شوری (60 میلی مولار) به طور کامل متوقف نشد. به طور کلی، نتایج نشان داد که اثر مخرب تنش شوری بر صفتهای رشدی، زینتی و فیزیولوژیکی گل نرگس بیشتر از تنش خشکی بود.

منابع

- 1- Abedi T., and Pakniyat H. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46(1): 27-34.
- 2- Afshar Mohammadian M., Ebrahimi Nokandeh S., and Jamalomid M. 2015. The effect of different levels of salinity on some non-enzymatic antioxidants of three cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Crop Physiology Journal 6(24): 57-71. (In Persian)
- 3- Ahmadi S.H., and Niazi Ardekani J. 2006. The effect of water salinity on growth and physiological stages of eight Canola (*Brassica napus*) cultivars. Irrigation Science 25: 11-20. (In Persian)
- 4- Al-Moftah A.E., and Al-Humaid A.R.I. 2005. Response of vegetative and reproductive parameters of water stressed tuberose plants to vapor gard (VG) and kaolin antitranspirants (AT). Arab Gulf Journal of Scientific Research 23(1): 7-14.
- 5- Apel K., and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Plant Biology 55:373-399.
- 6- Bahadoran M., and Salehi H. 2015. Growth and flowering of two tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cultivars under deficit irrigation by saline water. Journal of Agricultural Science and Technology 17(2): 415-426.
- 7- Bakhshi Khaniki G., Javadi S., Mehdikhani P., and Tahmasebi D. 2011. Investigation of drought stress effects on some quantity and quality characteristics of new eugenics sugar beet genotypes. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 1(3): 65-74. (In Persian)
- 8- Bideshki A., and Arvin M.J. 2010. Effect of salicylic acid (SA) and drought stress on growth, bulb yield and allicin content of garlic (*Allium sativum*) in field. Plant Ecophysiology 2: 73-79. (In Persian)
- 9- Bissuel-Belaygue C., Cowan A.A., Marshall A.H., and Wery J. 2002. Reproductive development of white clover (*Trifolium repens* L.) is not impaired by a moderate water deficit that reduces vegetative growth. Crop Science 42(2): 414-422.
- 10- Borzouei A., Kafi M., Khazaei H., and Mousavi Shalmani M. 2012. Effect of irrigation water salinity on root traits of two salt-sensitive and salt-tolerant wheat cultivars and its relationship with yield in greenhouse. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 2(4): 95-107. (In Persian)
- 11- Dadras N., Besharati H., and Ketabchi S. 2012. Effects of salt stress induced by sodium chloride on growth and biological nitrogen fixation in soybean cultivars. Journal of Soil 26: 141-137. (In Persian)
- 12- Davarynejad G., Shirbani S., and Zarei M. 2015. Effects of deficient irrigation on some of the morpho-physiological characteristics of four fig cultivars. Journal of Horticulture Science, 29(4): 501-517. (In Persian)
- 13- De R., and Kar R.K. 1995. Seed germination and seedling growth of mung bean under water stress by PEG 6000. Seed Science and Technology 23(2): 301-308.
- 14- Dehghan H., Alizadeh A., Esmaili K., and Nemati H. 2015. Root growth, yield and yield components of tomato under drought stress. Journal of Water Research in Agriculture 29(2): 169-179. (In Persian)
- 15- Dehghan A., and Rahimmalek M. 2018. The effect of salt stress on morphological traits and essential oil content of Iranian and foreign yarrow (*Achillea millefolium* L.) genotypes. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 9(2): 23-38. (In Persian)
- 16- Eskandari-Zanjani K., Shirani Rad A.H., Bitarafan Z., Aghdam A.M., Taherkhani T., and Khalili P. 2012. Physiological response of sweet wormwood to salt stress under salicylic acid application and non-application conditions. Life Science Journal 9(4): 4190-4195.
- 17- Fabriki Ourang S., and Mehrabad-Pourbenab S. 2016. The effects of drought and salt stresses on some morphological and biochemical parameters of savory (*Satureja hortensis* L.). Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 4(3): 23-35. (In Persian)
- 18- Fallah A., Farahmanfar E., and Moradi F. 2015. Effect of salt stress on some morphophysiological characters of two rice cultivars during different growth stages at greenhouse. Applied Field Crops Research 28(107): 175-182. (In Persian)

- 19- Franco J.A., Banon S., Vicente M.J., Miralles J., and Martinez-Sanchez J.J. 2011. Root development in horticultural plants grown under abiotic stress conditions-a review. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 86: 543-556.
- 20- Ghasemi-Phyrouzabadi A. 2001. Evaluation of salinity resistance in two rangeland species *Aeluropus litoralis* and *Puccinella diatance*. MS.c.Thesis, Faculty of Natural Resources, University of Tehran. (In Persian)
- 21- Ghasemi A. 2009. Medicinal and aromatic plants. Islamic Azad University Press. Shahrekord, 536. (In Persian)
- 22- Gholami-Touranposhti M., Maghsoudi Moud A.A., and Manouchehri-Kalantari K. 2005. Salt stress effect on the photosynthetic capacity of three Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) clones. The 4th National Biotechnology Congress of Kerman. (In Persian)
- 23- Ghorbanali M., and Niakan M. 2005. Evaluation of drought stress effect on soluble sugars content, protein, proline and phenolic compounds and nitrate reductase activity in soybean cultivar Gorgan 3. Iranian Journal of Science Education 1(2): 537-550. (In Persian)
- 24- Hajmohammadnia-Ghalibaf K., and Selahvarzi Y. 2012. Physiological responses of kallar grass (*Leptochloa fescua* L. kunth) to combined salinity and drought stresses under controlled conditions. Environmental Stresses in Crop Sciences 4(2): 105-115. (In Persian)
- 25- Jaimez R., Vielma O., Rada F., and García-Núñez C. 2000. Effects of water deficit on the dynamics of flowering and fruit production in capsicum chinense Jacq in a tropical semiarid region of Venezuela. Journal of Agronomy and Crop Science 185(2): 113-119.
- 26- Javanmardi J., Khalighi A., Khashi A., Bais H.P., and Vivanco J.M. 2002. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 58-78.
- 27- Javadipour Z., Movahhedi Dehnavi M., and Balouchi H. 2013. Changes in leaf proline, soluble sugars, glycinebetaine and protein content in six spring safflowers under salinity stress. Journal of Plant Process and Function 1(2): 13-23. (In Persian)
- 28- Kafi M., Bagheri A., Nabati J., Zare-Mehrjerdi M., and Masomi A. 2011. Effect of salinity on some physiological variables of 11 chickpea genotypes under hydroponic conditions. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 1(4): 55-70. (In Persian)
- 29- Kerepesi H., and Galiba G. 2000. Osmotic and salt stress Induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedling. Crop Science 40: 482-487.
- 30- Kim B.J., Kim J.H., Kim H.P., and Heo M.Y. 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): Antioxidative activity and free radical scavenging activity. International Journal of Cosmetic Science 19(6): 299-307.
- 31- Kinghorn A.D. 1987. Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. Journal of Natural Products 50(6): 1009-1024.
- 32- Klimczak I., Maecka M., Szlachta M., and Gliszczyn A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis 20: 313-322.
- 33- Kontogiorgis C.A., and Hadjipavlou-Litina D.J. 2005. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. Medicinal Chemistry 48: 6400-6408.
- 34- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., and Becker D.F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. Antioxidants and Redox Signaling 19: 998-1011.
- 35- Li X.F., Shao X.H., Deng X.J., Wang Y., Zhang X.P., Jia L.Y., and Xu L. 2012. Necessity of high temperature for the dormancy release of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Journal of Plant Physiology 169(14): 1340-1347.
- 36- Lloyd J., and Howie H. 1989. Response of orchard 'washington navel' orange, (*Citrus sinensis* L.) osbeck to saline irrigation water. Canopy characteristics and seasonal patterns in leafosmotic potential, carbohydrates and ion concentrations. Australian Journal of Agricultural Research 40: 359-69.
- 37- Mahajan S., and Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444(2): 139-158.
- 38- McCready R.M., Guggolz J., Silviera V., and Owens H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry 22: 1156-1158.
- 39- Moghbeli E., Fathollahi S., Salari H., Ahmadi G., Saliqehdar F., Safari A., and Hosseini Grouh M. 2012. Effects of salinity stress on growth and yield of *Aloe vera* L. Journal of Medicinal Plants Research 6(16): 3272-3277.
- 40- Mortezae-nezhad F., and Jazi-zadeh E. 2017. Effects of water stress on morphological and physiological indices of *Cichorium intybus* L. for introduction in urban landscapes. Journal of Plant Process and Function 6(21): 279-290. (In Persian)
- 41- Mohammadi Torkashvand A., and Toofighi Alikhani T. 1394. The impact of drought stress of the cultivation medium on the growth and postharvest life of liliun and chlorophyll in different potassium concentrations of nutrient solution. Journal of Ornamental Plants 5(2): 123-130.
- 42- Murthy Z.V.P., and Lad V.N. 2013. Phenology of *Aloe barbadensis* Miller: A naturally available material of high therapeutic and nutrient value for food applications. Journal of Food Engineering 115: 279-284.

- 43- Nakhaei, F., Khalighi, A., Naseri, M. and Abroumand, P. 2008. The investigation of chemical components in essential oil of *Narcissus tazetta* L. Flowers under farm and natural conditions in south khorasan. Journal of Horticulture Science (Agricultural Sciences and Technology) 22(2): 123-131. (In Persian with English Abstract)
- 44- Pessarakli M. 1995. Hand book of plant and crop physiology. Public. Narcel Dekker. Inc. 223-242.
- 45- Pessarakli M., and Kopec D.M. 2008. Comparing growth responses of selected cool-season turfgrasses under salinity and drought stresses. Turfgrass, Landscape and Urban IPM Research Summary. P-155.
- 46- Pourmorad F., Hosseiniimehr N., and Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, Phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medical plants. African Journal of Biotechnology 5(11): 1142-1145.
- 47- Rostami M., Mohammad-Parast B., and Golfam R. 2015. The effect of different levels of salinity stress on some physiological characteristics of saffron (*Crocus sativus* L.). Saffron Agronomy and Technology 3(3): 193-179. (In Persian)
- 48- Sadeghi H., and Khani K. 2012. Effects of different drought and salinity stress levels on some morphological characteristics and proline content of annual burr medic (*M. polymorpha* L.). Iranian Dryland Agronomy Journal 1(2): 1-13. (In Persian)
- 49- Sanjarimijani M., Sirousmehr A.R., and Fakheri B. 2016. The effects of drought stress and humic acid on morphological traits, yield and anthocyanin of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Agroecology 8(3): 346-358. (In Persian)
- 50- Salami M.R., Safarnejad A., and Hamidi H. 2006. Effect of salinity stress on morphological characters of *cuminum cuminum* and *valeriana officinalis*. Journal of Pajouh and Sazandegi 72: 77-83. (In Persian)
- 51- Sarker B.C., Hara M., and Uemura M. 2005. Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. Science Horticulture 103:387-402.
- 52- Sepaskhah A.R., and Yarami N. 2009. Interaction effects of irrigation regime and salinity on flower yield and growth of saffron. Journal Horticulture Science Biotechnol 84: 216-222.
- 53- Shahbazi H., Arzani A., and Esmaelzadeh-Moghadm M. 2016. Effects of drought stress on physiological characteristics in wheat recombinant inbred lines. Journal of Plant Process and Function 5(15): 123-132. (In Persian)
- 54- Sharifi M., Ghorbanli M., and Ebrahimzadeh H. 2006. Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. Journal of Plant Physiology 164(9): 1144-1151.
- 55- Shao H.B., Chu L.Y., Jaleel C.A., and Zhao C.X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants, Comptes Rendus Biologies 331: 215-225.
- 56- Shannon M.C. 1986. Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In: Staples R.C., and G.H. Toenniessn (eds). Salinity Tolerance in Plants. John Wiley and Sons 10: 231-252.
- 57- Shillo R., Ding M., Pasternak D., and Zaccai M. 2002. Cultivation of cut flower and bulb species with saline water. Science Horticulture 92: 41-54.
- 58- Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.
- 59- Silva J.V., Lacerd C.F., Costa P.H.A., Filho J.E., Filho E.G., and Prisco J.T. 2003. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂ . Brazilian Journal of Plant Physiology 15: 99-105.
- 60- Stanton M., Roy B., and Thiede D. 2000. Evolution in stressful environments. I. Phenotypic variability, phenotypic selection, and response to selection in five distinct environmental stresses. Evolution 54(1): 93-111 .
- 61- Soleimani S., Bernard F., Amini M., and Khavari-nezhad R. 2007. Alkaloids from *Narcissus tazetta* L. Journal of Medicinal Plants 4(24): 58-63. (In Persian)
- 62- Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U., and Weshke W. 2000. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). Plant Physiology 109(4): 435-442.
- 63- Tabatabae S.A., Ghasemi A., and Shakeri E. 2012. Effect of water stress on yield, yield components and oil quantity of canola cultivars. Crop Physiology Journal 3(12): 41-53. (In Persian)
- 64- Ueda A., Kanechi M., and Uno Y. 2003. Photosynthetic limitations of a halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.) under water stress and NaCl stress. Journal of Plant Research 116(1): 63-68.
- 65- Van-Dort H.M., Jagers P.P., and Heide R. 1993. *Narcissus trevithian* and *Narcissus geranium*: analysis and synthesis of compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41(11): 2063-2075.
- 66- Valifard M., Mohsenzadeh S., Kholdebarin B., and Rowshan V. 2014. Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. South African Journal of Botany 93: 92-97.
- 67- Veatch-Blohm M.E., Chen D., and Hassett M. 2013. *Narcissus* cultivar differences in response to saline irrigation when application began either pre-or postemergence. HortScience 48(3): 322-329.
- 68- Yousef A.M. 2009. Salt tolerance mechanisms in some halophytes from Saudi Arabia and Egypt. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 5: 191-206.



Effect of Drought and Salinity Stress on Growth, Flowering and Biochemical Characteristics of *Narsicuss tazetta* L.

A. Naseri Moghadam⁴- H. Bayat^{2*}- M.H. Aminifard³- F. Moradinezhad⁴

Received: 05-12-2018

Accepted: 26-06-2019

Introduction: Salinity and drought have adverse impacts on crop production throughout the world, especially in arid and semiarid areas. Salinity decreases crop growth and yield through modifications of ion balance, water status, stomatal behavior, photosynthetic efficiency, salinity-induced nutrient deficiency and changes to the soil structure. Drought is another one of the main factors limiting the growth and development through the anatomical, morphological, and physiological and biochemical changes that the severity of drought damage varies depending on the duration of the stress and plant growth stage. Water stress reduces relative water content, photosynthesis pigments, stomatal conductance, biomass, growth and ultimately plant performance. *Narcissus (Narsicuss tazetta* L. cv. 'Shahla') belongs to the Amaryllidaceae family is grown as a cut flower, landscape and medicinal plant that grows throughout the world except tropical regions. It is necessary to know the tolerance of *N. tazetta* to drought and salinity stress in order to produce optimal product. According to previous studies, no complete research has been done on the effects of drought and salinity stress on *N. tazetta*. Therefore, the present study was carried out with the aim of investigating the combined effects of drought and salinity stress on growth, flowering and biochemical characteristics of *N. tazetta*.

Materials and Methods: This research was carried out in Faculty of Agriculture, University of Birjand, in 2017. A pot experiment was conducted in completely randomized design with factorial arrangement and three replications. The treatments included sodium chloride (NaCl) in four levels 0 (control), 20, 40 and 60 mM and drought stress in four levels 30, 50, 70 and 90% of field capacity. The plants were harvested four months after the start of salt and drought treatments. The investigation traits were included vegetative, reproductive and biochemical characteristics. Measured traits were included root length, volume of root, root fresh weight, bulb length, bulb fresh weight, shoot fresh weight, total dry weight, flower diameter, flower crown diameter, stem diameter, days from planting to flowering, days from flowering to senescence, antioxidant activity, total phenolic content and total soluble sugar of leaf and root. The data were analyzed by SAS version 9.4 and the means separated by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$. Excel was used to draw graphs.

Results and Discussion: The results of simple effects showed that drought and salinity stresses decreased the values of flowering stem diameter, flower diameter, root length, root volume, root fresh weight, bulb fresh weight, bulb length, shoot fresh weight, total dry weight and days from flowering to senescence. In contrast, the values of the number of days from sowing to flowering, total soluble sugars of leaf and root, antioxidant activity and total phenolic content increased under the influence of these two stresses. The results of interaction effects showed that the destructive effects of salinity and drought stress were intensified in co-application conditions, so that the lowest values of growth and reproductive traits were observed in the most severe stress (30% field capacity $\times$ 60 mM salinity). Usually, root and shoot length in sodium chloride solution is reduced due to the toxicity of ions and their negative effects on cell membranes. Drought stress and salinity reduce cell division and also reduce the size of cells and consequently the length of the plant decreases. Delay in flowering is due to multiple stresses (osmotic imbalance, nutrient insufficiency and cellular toxicity) that is caused by salinity and drought stresses. These stresses produce ROS compounds that damage the proteins, lipids, carbohydrates, and nucleic acids. Plants for scavenging and detoxifying these compounds from the cell surface use enzymatic (catalase, superoxide dismutase, etc.) and non-enzymatic (phenolic compounds and carotenoids) defense systems that increase the antioxidant activity of the plant.

Conclusion: The results of this study showed that drought and salinity stresses had negative effects on growth and flowering traits, which was exacerbated by the combined application of these two stresses. On the other hand, the highest levels of antioxidant activity, total phenolic content and total soluble sugars were obtained under severe stress conditions (drought or salinity). Salinity and drought stress reduced the flowering rate, quality of flowers and the flower life on the plant, but all the levels of stress reached to flowering stage.

1, 2, 3 and 4- M.Sc. Student, Assistant Professors and Associate Professor, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: hassanbayat@birjand.ac.ir)

Also, the growth of narcissus plant was not affected by the highest levels of drought (30% crop capacity) and salinity (60 mM) stress. In general, the results showed that both drought and salinity stress reduced the growth and yield of narcissus flower, but the destructive effects of salinity stress on the growth, ornamental and physiological traits of narcissus flower were more than drought stress.

Keywords: Antioxidant activity, Flower diameter, Root volume, Total phenolic content, Total soluble sugar



بررسی تأثیر محیط کشت‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کشت تک گره گیاه پیپنو (*Solanum muricatum* Aiton) در شرایط کشت بافت

مائه عقدایی^۱ - سید حسین نعمتی^{۲*} - لیلا سمیعی^۳ - احمد شریفی شریف آباد^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۳۱

چکیده

پیپنو یک سبزی میوه‌ای متعلق به خانواده سولاناسه بوده که مشکل اساسی در توسعه‌ی کشت این گیاه تکثیر آن می‌باشد که از طریق بذر موفقیت اندکی دارد. از این رو این پژوهش با هدف تکثیر انبوه از طریق کشت بافت انجام گردید. به منظور دستیابی به بهترین نوع محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از ریزنمونه تک گره پیپنو استفاده گردید. این تحقیق در قالب سه آزمایش جداگانه با استفاده از چهار نوع محیط کشت (MS، ½ MS، SH و B₅)، دو نوع سیتوکنین (بنزیل آدنین (BA) و کینتین (Kin)) و دو نوع اکسین (اینډول بوتریک اسید (IBA) و نفتالین استیک اسید (NAA)) برای تعیین بهترین محیط کشت و دستیابی به ترکیب مناسبی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ریزنمونه تک گره پیپنو با توجه به تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ محیط کشت پایه MS بود. در آزمایش پرآوری شاخه، بیش‌ترین تعداد شاخساره، تعداد برگ، رنگ شاخساره و کیفیت شاخساره القا شده در اثر کاربرد محیط کشت MS غنی شده با دو میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد. همچنین بیش‌ترین میزان طول شاخساره و طول برگ به ترتیب با کاربرد محیط کشت MS غنی شده با یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با دو میلی‌گرم در لیتر Kin و تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. در آزمایش ریشه‌زایی، بیش‌ترین میانگین تعداد ریشه و کیفیت ریشه با استفاده از IBA با غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد، در حالی که بیش‌ترین میانگین طول ریشه با کاربرد IBA با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در مجموع بهترین نتایج با محیط کشت MS، غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin جهت پرآوری و همچنین غلظت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر IBA جهت ریشه‌زایی ریزنمونه پیپنو به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: اینډول بوتریک اسید، بنزیل آدنین، پیپنو، پرآوری، ریشه‌زایی، کشت بافت

مقدمه

خشک شده و کنسرو شده مصرف می‌شود (۱۶، ۱۷ و ۴۰). داشتن میوه‌های خوراکی آبدار، معطر و شیرین، تنوع زیاد در رنگ و شکل میوه و همچنین مصارف مختلف این محصول منجر به پرورش تجاری آن در کشورهای آمریکای جنوبی از جمله بولیوی، کلمبیا، اکوادور و پرو و همچنین کشورهایی نظیر نیوزیلند و استرالیا شده است (۳۰). این گیاه به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص برای نخستین بار در سال ۱۳۸۲ در ایران معرفی و جهت بومی‌سازی مورد توجه قرار گرفت (۱۹).

هرچند اغلب ارقام پیپنو از نظر جنسی بارور بوده و بذره‌های زنده تولید می‌کنند، اما قدرت جوانه‌زنی ضعیف بذر و سطح بالای هتروزیگوتی بذر که منجر به تفرق صفات در دانه‌ها می‌شود، به عنوان دو عامل منفی و تأثیرگذار در زمینه‌ی تکثیر این گیاه از طریق بذر می‌باشد (۲۵، ۲۷، ۲۹ و ۳۰). میزان جوانه‌زنی بذر پیپنو در

پیپنو (*Solanum muricatum* Aiton) گیاهی علفی و دیپلوئید ($2n=24$) متعلق به خانواده سولاناسه^۵ منشأ گرفته از کوه‌های آند بوده، که در مناطق مختلف دارای نام‌های مختلفی از جمله پیپنو، خربزه‌ی گلابی، گلابی خربزه، شاه کیوی و توما می‌باشد (۳، ۵، ۷، ۱۶ و ۳۰). پیپنو به عنوان یک سبزی میوه‌ای تقریباً ناشناخته به صورت میوه تازه، سبزی پخته شده، یخ‌زده، سالاد میوه، آب‌میوه، شربت، ژله،

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته دکتری و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*) نویسنده مسئول: Email: Nemati@um.ac.ir

۳- استادیار گروه گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

بستر خاکی، پتری دیش و بستر پیت به ترتیب ۴، ۲۸ و ۵۶ درصد گزارش شده است (۱۹)، که بیانگر قدرت جوانه زنی ضعیف بذر این گیاه به ویژه در بستر خاکی و ضرورت کاربرد روش های تکثیر رویشی به منظور ازدیاد این گیاه می باشد. با وجود اینکه قلمه زدن رایج ترین روش تکثیر پیپنو می باشد (۱۲ و ۲۸)، ازدیاد این گیاه از طریق قلمه به دلیل خطر انتقال بیماری های ویروسی با مشکل روبرو می باشد (۳۷).

کشت درون شیشه ای، به عنوان یک روش جایگزین برای ازدیاد گیاهان، منجر به ایجاد تحولی عظیم در تکثیر گیاهان شده است (۲۶). با توجه به مشکلات بیان شده در مورد تکثیر پیپنو از طریق بذر و قلمه، از تکنیک های مختلف کشت بافت می توان در جهت تکثیر و تولید انبوه پیپنو، تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل بیماری زا استفاده نمود. تاکنون مطالعات محدودی در زمینه ی ریزازدیادی پیپنو با استفاده از ریزنمونه های کشت تک گره و نوک شاخه (۶ و ۲۷)، پروتوپلاست (۳۳) و باززایی شاخه از کالوس (۳۴) انجام شده است. آتکینسون و گاردنر (۲) بذور گیاه پیپنو را پس از استریل کردن (به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم)، بر روی محیط کشت پایه MS (حاوی ویتامین های B₅، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار) پرورش دادند. جهت پرآوری شاخه و ایجاد شاخه های جانبی ریزنمونه های تک گره و نوک شاخه گیاهچه های پیپنو حاصل از کشت بذر در شرایط درون شیشه ای، از محیط MS غنی شده با سه درصد ساکاروز، ویتامین ها، ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۰/۷ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر GA3 استفاده کردند (۲، ۱۳ و ۲۵). همچنین کاووسگلو و سولوسگلو (۶) محیط MS غنی شده با غلظت یک میلی گرم در لیتر BAP را به عنوان بهترین محیط جهت پرآوری شاخه در هر ریزنمونه تک گره و غلظت دو میلی گرم در لیتر NAA را به عنوان بهترین محیط ریشه زایی معرفی کردند. در مطالعه ای دیگر، پریک (۲۷) شاخچه های پیپنو را در محیط کشت MS غنی شده با دو درصد ساکارز و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA ریشه دار کرد. با وجود تحقیقات محدود انجام گرفته بر روی گیاه پیپنو، هنوز مشکل تکثیر این گیاه به قوت خود باقی مانده است و نیازمند انجام تحقیقاتی بیش تر و دقیق تر در این راستا می باشد. از اینرو پژوهش حاضر با هدف تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده های رشدی جهت ریزازدیادی پیپنو انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

محل انجام آزمایش و نحوه ی تهیه ریزنمونه

این پژوهش در قالب سه آزمایش جداگانه در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال

۱۳۹۵ انجام پذیرفت. بدین منظور بذور پیپنو از شرکت Plant World Seed انگلستان خریداری گردید. به منظور گندزدایی سطحی، بذور به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت چهار دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند و نهایتاً به مدت ۴/۵ دقیقه سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور گندزدایی شده جهت جوانه زنی، در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ^۱) استریل شده (به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد) کشت گردیدند. ظروف کشت در اتاقک رشد و تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور حدود ۳۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهچه های حاصل از جوانه زنی بذور به عنوان مواد مادری برای تأمین ریزنمونه تک گره به کار گرفته شدند.

تعیین بهترین محیط کشت

به منظور تعیین مناسب ترین محیط کشت جهت ریزازدیادی گیاه پیپنو، آزمایشی به صورت فاکتوریل (با آرایش ۲×۴) شامل دو فاکتور محیط کشت و زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار و پنج تکرار (هر تکرار حاوی ۴ ریزنمونه) طراحی گردید. بدین منظور در زیر هود استریل ریزنمونه های تک گره به طول ۱۰ میلی متر حاوی جوانه از گیاهان مادری جدا شده و بر روی محیط کشت ها مختلف (MS، ۱/۲ SH، SH (شنک و هیلدبرانت^۲) و B₅ گامبورگ^۳) کشت گردید. ارزیابی اثر محیط کشت بر تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ در طی زمان های دو و چهار هفته پس از کشت ریز نمونه ها بررسی شد.

مرحله پرآوری

جهت بررسی تأثیر بنزیل آدنین (BA)^۴ و کینتین (Kin)^۵ بر پرآوری شاخساره در محیط پایه ی MS، BA با غلظت های نیم، یک و دو میلی گرم در لیتر در ترکیب با غلظت های نیم، یک و دو میلی گرم در لیتر Kin و همچنین BA به تنهایی با غلظت های دو، چهار و شش میلی گرم در لیتر استفاده گردید. قبل از اتوکلاو کردن pH محیط کشت بر روی ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه های حاوی تک گره در زیر هود استریل به محیط کشت انتقال یافتند. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سیزده تیمار و پنج تکرار که تعداد مشاهده در هر تکرار ۴ ریزنمونه بود انجام گردید. شاخص های کمی از جمله تعداد شاخساره القا شده، طول شاخساره، تعداد برگ، طول برگ و

1- Murashige and Skoog

2- Schenk and Hildebrandt (SH)

3- Gamborg (B₅)

4- Benzyl adenine (BA)

5- Kinetin (Kin)

شاخص‌های مختلف رشدی پپینو تأثیر معنی‌داری داشت، در حالی که هیچ یک از صفات مورد بررسی تحت تأثیر برهمکنش این دو عامل (محیط کشت و زمان) قرار نگرفت. براساس نتایج، تمامی صفات اندازه‌گیری شده در زمان چهار هفته پس از کشت افزایش معنی‌داری در مقایسه با دو هفته پس از کشت نشان دادند (جدول ۱).

براساس نتایج، نوع محیط کشت در میزان موفقیت تکثیر کشت بافت پپینو نقش مهمی داشت و همه‌ی فاکتورهای مورد بررسی تحت تأثیر نوع محیط کشت قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ریزنمونه‌ها از نظر تعداد شاخساره در محیط کشت MS نسبت به سه محیط کشت دیگر واکنش بهتری نشان دادند و بیش‌ترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS به‌دست آمد، در حالی که بیش‌ترین طول شاخساره مربوط به محیط MS $\frac{1}{2}$ بود که تفاوت معنی‌داری را نسبت به محیط B5^۳ نشان داد (جدول ۲). همچنین بیش‌ترین تعداد ریشه و طول ریشه به‌ترتیب مربوط به محیط کشت های MS و MS $\frac{1}{2}$ بود. از نظر تعداد برگ بین محیط کشت‌های MS، MS $\frac{1}{2}$ و B5 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و تنها کاهش معنی‌داری در محیط SH^۴ مشاهده شد، در حالی که بیش‌ترین طول برگ در محیط کشت MS حاصل گردید که منجر به بروز اختلاف معنی‌دار نسبت به محیط کشت‌های دیگر گردید (جدول ۲). در مجموع نتایج این آزمایش نشان داد که در بین محیط کشت‌های مورد بررسی، بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی ریزنمونه تک گره پپینو با توجه به تعداد شاخساره، طول شاخساره، تعداد ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و طول برگ محیط کشت پایه MS می‌باشد (جدول ۲).

هرچند مطالعات زیادی در مورد ریزازدیادی و به‌ویژه در مورد تأثیر و مقایسه‌ی محیط کشت‌های مختلف بر کشت درون شیشه‌ای پپینو وجود ندارد، با این وجود در بیش‌تر پژوهش‌های انجام گرفته بر روی پپینو (۲، ۶، ۱۳، ۲۵ و ۲۷) همواره محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شده است. نتایج به‌دست آمده در این آزمایش مبنی بر برتری محیط کشت MS در مقایسه با دیگر محیط کشت‌های با نتایج هدایت و خوشخوی (۱۱) روی گیاه پیرتروم مطابقت دارد؛ این محققین با بررسی محیط کشت‌های مختلف (MS، SH و B5) بر ریزافزایی گیاه پیرتروم^۵ بیان کردند که بیش‌ترین تعداد، طول و وزن تر شاخساره‌ها در محیط کشت MS حاصل گردیده که منجر به برتری این محیط کشت در مقایسه با محیط کشت‌های SH و B5 شده است، و دلیل این امر را بهینه‌تر بودن محیط کشت MS و به‌عبارتی مناسب‌تر بودن نمک‌های تشکیل دهنده‌ی محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر ذکر کردند (۱۱). محیط کشت

کیفی (کیفیت شاخساره (بالا‌ترین کیفیت ۴، کیفیت متوسط ۳، کیفیت کم ۲ و بدون کیفیت ۱) و رنگ شاخساره‌های گیاه (رنگ سبز تیره ۳، سبز زرد ۲ و زرد ۱)) مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص‌های کمی مربوط به طول شاخساره و طول برگ با خط‌کش مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

مرحله ریشه‌زایی

جهت تعیین بهترین ترکیب و مناسب‌ترین غلظت تنظیم کننده‌های رشدی گیاهی جهت ریشه‌زایی ریزنمونه پپینو، شاخساره‌هایی با طول پنج سانتی‌متر از محیط پرآوری شاخه جدا شده و به ظروف مربایی حاوی ۳۵ میلی‌لیتری از محیط MS فاقد هورمون (به‌عنوان شاهد) و محیط MS غنی شده با ایندول بوتریک اسید^۱ (۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) یا نفتالین استیک اسید^۲ (۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. چهار شاخچه در هر شیشه مربایی (به‌عنوان یک تکرار) کشت گردید. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید و شاخص‌های رشدی مرتبط با ریشه‌زایی از جمله تعداد ریشه و طول بلندترین ریشه و همچنین کیفیت ریشه در زمان چهار هفته پس از کشت ارزیابی شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده که دارای وضعیت رشدی مناسبی بودند از محیط کشت خارج و پس از شستن ملایم ریشه‌ها با آب مقطر و حذف کامل آگار از محیط اطراف ریشه، برای گذراندن مرحله سازگاری به سه نوع محیط کشت پیت + ماسه (با نسبت مساوی)، پیت + پرلایت (با نسبت مساوی) و یا پیت خالص منتقل شدند (شکل ۵) و پس از گذشت دو هفته به مرور پلاستیک‌های کشیده شده بر روی آن‌ها قیچی شد تا کم کم با هوای گلخانه گیاهان سازگار شوند. درنهایت بعد از یک ماه به گلدان‌های بزرگتر بدون روکش مطابق شکل ۶ منتقل شدند و درصد سازگاری گیاهان بعد از دوماه محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۳ و مقایسه میانگین صفات بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی محیط کشت‌ها

نتایج نشان داد که نوع محیط کشت و زمان داده‌برداری بر

3- Gamborg et al.

4- Schenk and Hilderbrandt

5- *Tanacetum cinerariaefolium*

1- Indole-3-butyric acid (IBA)

2- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

MS از نظر چندین نمک معدنی پرمصرف از جمله نیترات و آمونیوم غنی تر می باشد. بنابراین مناسب تر بودن و رشد بیش تر ریزنمونه ها در محیط کشت MS نسبت به سایر محیط کشت ها احتمالاً ناشی از نیاز

بیش تر پرآوری شاخه و رشد شاخه پپینو به غلظت بالاتر نمک ها در این محیط کشت MS می باشد (۸ و ۱۸).

جدول ۱- تأثیر زمان نمونه برداری بر برخی شاخص های رشدی پپینو در شرایط درون شیشه ای

Table 1- Effect of sampling time on some growth parameters of pepino in vitro

زمان Time	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (mm)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length (mm)
تغییر رشد بعد از دو هفته Changing growth after two weeks	0.72 ^a	3.37 ^b	1.04 ^a	6.37 ^b	1.96 ^b	9.43 ^a
تغییر رشد بعد از چهار هفته Changing growth after four weeks	0.81 ^a	6.22 ^a	1.54 ^a	16.93 ^a	3.29 ^a	3.00 ^b

* میانگین هایی با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

جدول ۲- اثر محیط کشت های مختلف بر برخی شاخص های رشدی پپینو در شرایط درون شیشه ای

Table 2- Effect of different tissue cultures on some growth parameters of pepino in vitro

محیط کشت Tissue culture medium	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (mm)	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length (mm)
MS	1.35 ^a	6.41 ^{ab}	2.49 ^a	18.84 ^a	4.03 ^a	14.99 ^a
½ MS	1.16 ^b	7.84 ^a	1.96 ^b	20.35 ^a	3.96 ^a	11.42 ^b
SH	1.05 ^{bc}	6.22 ^{ab}	1.59 ^{bc}	13.15 ^{ab}	2.33 ^b	6.39 ^c
B5	0.92 ^c	5.45 ^b	1.21 ^c	7.01 ^b	4.10 ^a	10.93 ^b

* میانگین هایی با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

کاربرد هورمون BA و Kin) بود (شکل ۲). به طور کلی نتایج نشان داد که برای القای شاخه زایی در ریزنمونه تک گره پپینو و همچنین افزایش طول شاخه القا شده به دو نوع هورمون BA و Kin نیاز می باشد که براساس نتایج با افزایش غلظت BA تا سطح دو میلی گرم در لیتر روند افزایشی در پرآوری ریزنمونه مشاهده شد.

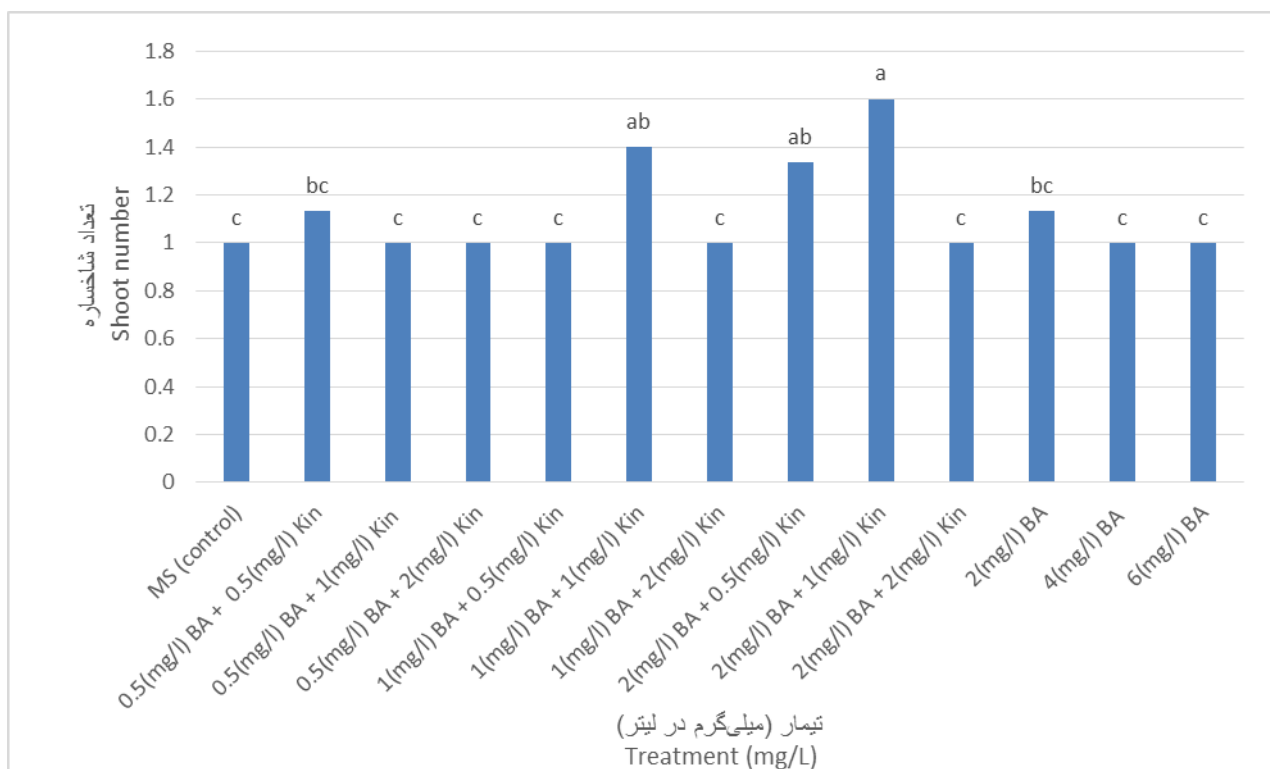
براساس نتایج، بیش ترین تعداد برگ در ریزنمونه، رنگ شاخساره و کیفیت شاخساره در محیط کشت MS حاوی دو میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin (2BA+1Kin) به دست آمد، در حالی که بیش ترین میزان طول برگ مربوط به تیمار یک میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin (1BA+1Kin) بود که موجب بروز اختلاف معنی دار نسبت به سایر تیمارهای اعمال شده گردید (جدول ۳). در مجموع، بهترین ترکیب سائتوکنین جهت پرآوری شاخه پپینو در محیط کشت MS، غلظت دو میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin بود که منجر به بروز اختلاف معنی دار نسبت به سایر تیمارها شد.

تعیین بهترین نوع و غلظت هورمون سیتوکنین جهت

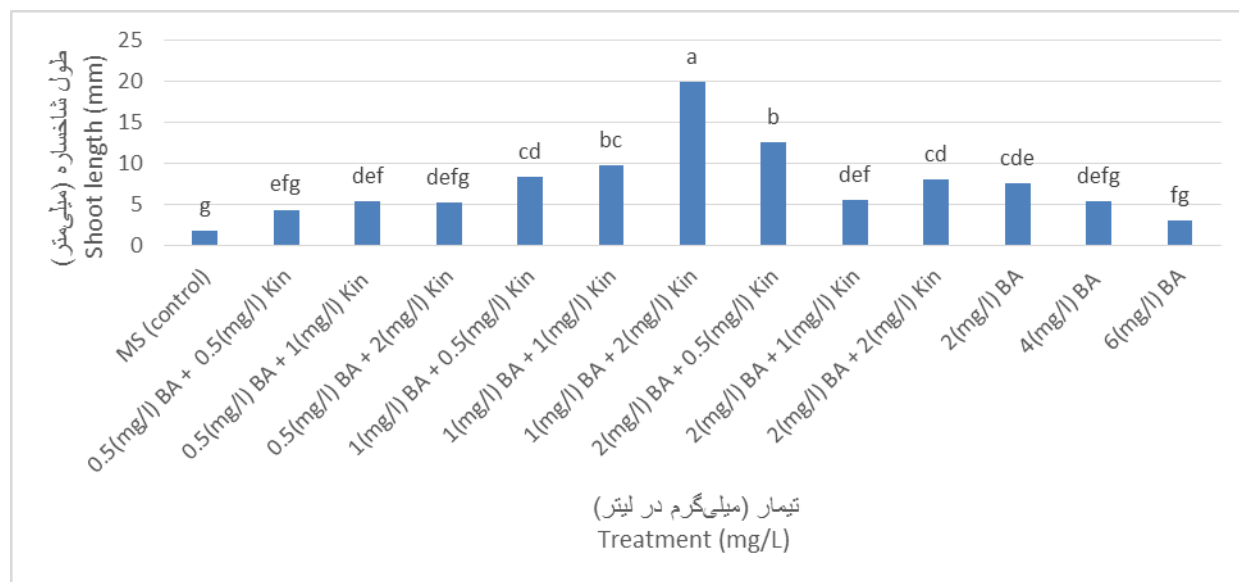
پرآوری ریزنمونه

بررسی نوع هورمون سیتوکنین بر میزان پرآوری ریزنمونه تک گره پپینو نشان داد که شاخص های مختلف رشدی تحت تأثیر نوع هورمون سیتوکنین قرار گرفت و غلظت بهینه ی تنظیم کننده های رشد گیاهی برای تولید شاخساره های نابه جا بین تیمارها متفاوت بود. بهترین ترکیب جهت باززایی شاخساره، محیط کشت MS غنی شده با غلظت دو میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر Kin بود (1Kin+2BA)، هر چند از نظر آماری با دو تیمار (1BA+1Kin) و (2BA+0.5Kin) تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل ۱).

بیش ترین طول شاخساره القا شده در تیمار یک میلی گرم در لیتر BA همراه با دو میلی گرم در لیتر Kin (1BA+2Kin) به دست آمد که منجر به بروز اختلاف معنی داری نسبت به بقیه تیمارها گردید، در حالی که کم ترین طول شاخساره مربوط به تیمار شاهد (MS) بدون



شکل ۱- تأثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و کینتین بر تعداد شاخساره در هر ریزنمونه پپینو در شرایط درون شیشه‌ای
Figure 1- Effect of different treatments of BA and Kin on number of shoots per explant of pepino *in vitro* (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بنزیل آدنین و کینتین بر طول شاخساره پپینو در شرایط درون شیشه‌ای
Figure 2- Effect of different treatments of BA and Kin on shoot length of pepino *in vitro* (LSD, $p \leq 0.05$)

جدول ۳- تأثیر تیمارهای بنزیل آدنین و کینتین بر برخی شاخص‌های رشدی پیپینو در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3- Effect of BA and Kin treatments on some growth parameters of pepino *in vitro*

تیمار Treatment	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length	رنگ شاخساره Shoot color	کیفیت شاخساره Shoot quality
MS (شاهد) MS (control)	3.73 ^e	4.37 ^{de}	2.00 ^c	1.20 ^{de}
۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l kin	4.00 ^{de}	4.57 ^{de}	2.00 ^c	1.27 ^{de}
۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۱ میلی گرم در لیتر کینتین 0.5 mg/l BA + 1 mg/l kin	5.60 ^{bcd}	6.77 ^{de}	2.00 ^c	1.47 ^{de}
۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۲ میلی گرم در لیتر کینتین 0.5 mg/l BA + 2 mg/l kin	4.80 ^{cde}	11.53 ^{bc}	2.00 ^c	3.00 ^b
۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین 1 mg/l BA + 0.5 mg/l kin	6.46 ^{abc}	7.00 ^{cde}	2.00 ^c	2.80 ^b
۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۱ میلی گرم در لیتر کینتین 1 mg/l BA + 1 mg/l kin	5.40 ^b	21.03 ^a	2.00 ^c	1.73 ^{cd}
۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۲ میلی گرم در لیتر کینتین 1 mg/l BA + 2 mg/l kin	6.73 ^{ab}	8.16 ^{cd}	2.87 ^a	3.13 ^b
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۰/۵ میلی گرم در لیتر کینتین 2 mg/l BA + 0.5 mg/l kin	4.47 ^{de}	5.73 ^{de}	2.00 ^c	2.13 ^c
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۱ میلی گرم در لیتر کینتین 2 mg/l BA + 1 mg/l kin	7.80 ^a	14.21 ^b	3.00 ^a	4.00 ^a
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین + ۲ میلی گرم در لیتر کینتین 2 mg/l BA + 2 mg/l kin	6.47 ^{abc}	4.41 ^{de}	2.93 ^a	2.73 ^b
۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین 2 mg/l BA	6.34 ^{abc}	6.69 ^{de}	2.60 ^b	2.87 ^b
۴ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین 4 mg/l BA	5.13 ^b	7.22 ^{cde}	2.07 ^c	2.07 ^c
۶ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین 6 mg/l BA	4.00 ^{de}	3.31 ^e	2.20 ^c	1.00 ^e

* میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

تولید شده باشد که سبب کاهش طول شاخساره شده است. مشخص شده است که در تیمارهایی که تعداد شاخه‌های باززایی شده افزایش می‌یابد به دلیل استفاده آن‌ها از هورمون‌ها و موادغذایی موجود در محیط کشت، شاخه‌های باززایی شده در این محیط‌ها از رشد کم‌تر برخوردار می‌باشند (۱۴).

در برخی از گونه‌ها جهت پرآوری شاخه از ترکیب هورمون‌های سیتوکینین و اکسین استفاده می‌کنند؛ از جمله سانتوموبی و شارما (۳۵) در بررسی کشت ریز نمونه‌های نوک شاخه فلفل بر روی محیط MS گزارش کردند که پرآوری شاخه در محیط کشت حاوی سیتوکینین‌ها به‌تنهایی یا در ترکیب با IAA رخ می‌دهد. همچنین در مطالعه دیگری، بهترین ترکیب جهت ریزازدیادی گیاه گوجه فرنگی را محیط کشت پایه MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شده است (۲۱).

پاسخ مورفوفیزیکی ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحت تأثیر اجزای مختلف محیط کشت از جمله غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی قرار می‌گیرد (۱۰). نتایج پژوهش حاضر در مورد غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نشان داد که افزایش غلظت BA در سطح بالاتر از دو میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS منجر به کاهش پرآوری شاخه پیپینو نسبت به غلظت دو میلی‌گرم در لیتر می‌شود، که این امر می‌تواند به‌دلیل مضر بودن مقادیر بیش از اندازه BA برای رشد شاخساره‌ها و همچنین نامناسب شدن شرایط کشت باشد (۲۰)، که نهایتاً سبب کاهش میزان پرآوری و میزان رشد شاخساره‌های القا شده می‌شود. براساس نتایج، میزان رشد شاخساره القا شده در تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin (2BA+1Kin)؛ به‌عنوان بهترین تیمار از نظر تعداد شاخساره به‌میزان بسیار کم بود (شکل ۳). به‌عبارتی دیگر، طول شاخساره در این تیمار تنها از شاخساره‌های تیمار شاهد بیش‌تر بود، که این کاهش میزان رشد می‌تواند به‌دلیل تعداد زیاد شاخساره



شکل ۳- ریزنمونه‌های گیاه پپینو کشت شده در محیط کشت حاوی 2 (mg/L) BA+ 1 (mg/L) Kin بعد از گذشت چهار هفته

Figure 3- Pepino explants on medium containing 2 (mg/L) BA+ 1 (mg/L) Kin after 4 weeks

است. در مجموع تأثیر مثبت سایتوکینین‌ها در پرآوری ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای می‌تواند به دلیل نقش مثبت سایتوکینین‌ها در اندام‌زایی و تسریع در تقسیم سلولی باشد. همچنین افزایش تعداد شاخساره در نتیجه کاربرد BA می‌تواند به دلیل کاهش چیرگی انتهایی در اثر کاربرد BA باشد که نهایتاً منجر به افزایش تعداد شاخساره شده است (۱۴).

تعیین بهترین نوع و غلظت هورمون اکسین جهت ریشه‌زایی ریزنمونه

بر اساس نتایج، ریشه‌زایی ریزنمونه را به طور معنی‌داری تحت تأثیر اکسین قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد تیمارهای اکسینی سبب افزایش تعداد ریشه در هر ریزنمونه شده است. کاربرد سه تیمار IBA با غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۶ میلی گرم در لیتر و همچنین NAA با غلظت ۰/۹ میلی گرم در لیتر بدون اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر سبب افزایش معنی‌دار تعداد ریشه نسبت به تیمار شاهد (محیط MS) گردید. با این وجود بیش‌ترین میانگین تعداد ریشه (۳۵ عدد) در تیمار IBA با غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر مشاهده شد که منجر به افزایش ۳/۵ برابری تعداد ریشه در مقایسه با تیمار شاهد گردید (شکل ۴).

طول بلندترین ریشه و کیفیت ریشه نیز تحت تأثیر تیمارهای اکسینی قرار گرفتند؛ بیش‌ترین طول ریشه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت ۰/۳ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد، در حالی که بهترین کیفیت ریشه مربوط به تیمار IBA با غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر بود (شکل ۵). شایان ذکر است که بین دو تیمار IBA با غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۶ میلی گرم در لیتر از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴). نتایج نشان داد که در افزایش طول ریشه و بهبود کیفیت ریشه هورمون IBA مؤثرتر از NAA بوده که به نوعی بیانگر تأثیر متفاوت اکسین‌ها بر عکس‌العمل ریزنمونه می‌باشد. در مجموع بیش‌ترین میزان ریشه و بهترین کیفیت ریشه‌ها

تیکلت و همکاران (۳۸) با کاربرد سیتوکینین‌های مختلف به تنهایی یا در ترکیب با هم در محیط کشت MS بیان کردند که بیش‌ترین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه و بلندترین طول شاخه مربوط به محیط MS حاوی یک میلی گرم در لیتر BA بوده است. هورمون BA برای تکثیر گونه‌های مختلف گیاهی از طریق کشت بافت به کار می‌رود و در برخی از مطالعات در اثر کاربرد BA نتایج مطلوب‌تری نسبت به سایر سایتوکینین‌ها حاصل شده است؛ از جمله گزارش شده است که تأثیر BA بر رشد توت فرنگی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به Kin و TDZ بهتر بوده است (۹). از طرف دیگر نیز گزارش‌هایی مبنی بر کارایی بهتر Kin در مقایسه با سیتوکینین‌های دیگر نیز در دسترس می‌باشد، که در این مورد می‌توان به نتایج بررسی ریزنمونه‌های تک گره تاجریزی^۱ روی محیط MS غنی شده با غلظت‌های مختلف Kin و BAP اشاره کرد که در این پژوهش مشخص شده است Kin در پرآوری شاخه و همچنین افزایش تعداد شاخه در هر ریزنمونه مؤثرتر از BAP بوده است (۲۳).

نتایج به دست آمده در این پژوهش مبنی بر تأثیر مثبت کاربرد ترکیب دو سیتوکینین (BA و Kin) در پرآوری شاخه با نتایج گزارش شده در استویا^۲ (۱) و توت فرنگی (۳۳) مطابقت دارد. به طوری که بیش‌ترین القای شاخه ریزنمونه استویا در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin به دست آمده است (۱). همچنین ساکیلا و همکاران (۳۳) جهت تکثیر درون شیشه‌ای توت فرنگی از قطعات گره ساقه به منظور پرآوری شاخه بر روی محیط کشت MS غنی شده با غلظت‌های مختلف BA به همراه Kin یا در ترکیب با GA₃ استفاده کردند و بیان کردند که بیش‌ترین پرآوری شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ تا ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin حاصل شده

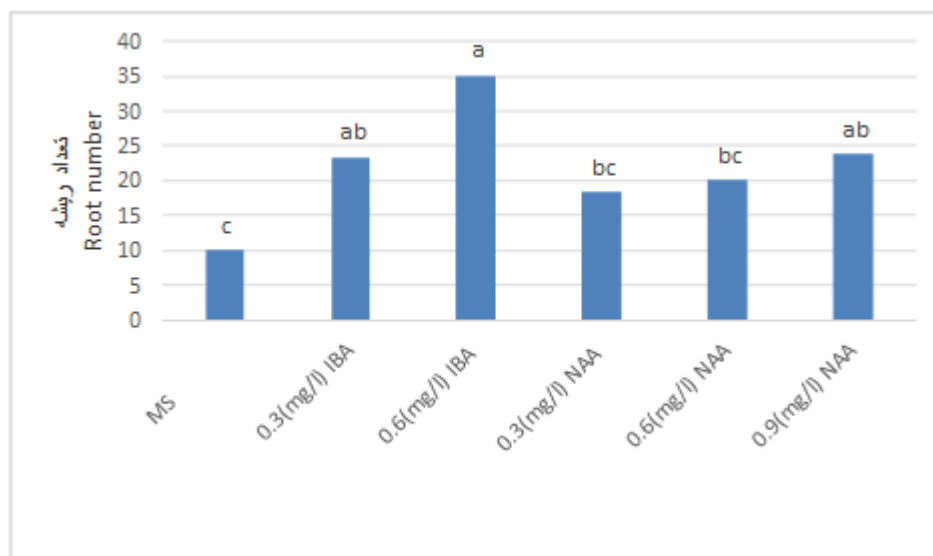
1- *Solanum nigrum*

2- *Stevia rebaudiana* Bertoni

رشدی مختلف از جمله تعداد ریشه، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کشت شده داشته است (۲۲). مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش آتکینسون‌گاردنر (۲) شاخه‌های حاصل از ریزازدیادی جوانه انتهایی پیپنو را پس از انتقال به محیط کشت MS غنی شده با ۰/۳ میلی گرم در لیتر IBA ریشه‌دار نمودند.

ریزنمونه پیپنو در محیط کشت MS حاوی غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد.

به‌خوبی مشخص شده است که نوع و غلظت اکسین مورد استفاده، به‌طور قابل ملاحظه‌ای درصد ریشه‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با بررسی ریزازدیادی فلفل دلمه‌ای بیان شده است که نوع هورمون و غلظت‌های مختلف آن تأثیرات متفاوتی بر پارامترهای



شکل ۴- تأثیر تیمارهای مختلف اکسین بر تعداد ریشه در هر ریزنمونه پیپنو

Figure 4- Effect of auxin different treatments on number of roots per explant of pepino (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۵- ریزنمونه‌ی ریشه‌دار شده پیپنو در تیمار ۰/۶ میلی گرم بر لیتر IBA

Figure 5- Rooted explants of pepino on medium containing 0.6 (mg/L) IBA

جدول ۴- تأثیر تیمارهای مختلف بر طول بلندترین ریشه و کیفیت ریشه پپینو
Table 4- Effect of different treatments on the longest root length and root quality of pepino

تیمار Treatment	طول بلندترین ریشه The longest root length (mm)	کیفیت ریشه Root quality
محیط MS (شاهد) MS culture (control)	1.78 ^c	2.00 ^b
۰/۳ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید 0.3(mg/L) IBA	4.63 ^a	3.33 ^{ab}
۰/۶ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید 0.6(mg/L) IBA	3.35 ^b	4.67 ^a
۰/۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید 0.3(mg/L) NAA	3.25 ^c	2.83 ^b
۰/۶ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید 0.6(mg/L) NAA	2.03 ^c	2.33 ^b
۰/۹ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید 0.9(mg/L) NAA	1.89 ^c	2.58 ^b

*میانگین‌هایی با حروف مشابه در هر ستون با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.
Means with the same letter in each column are not significantly different using LSD test at $p \leq 0.05$.

نش و تنها غلظت دو میلی‌گرم در لیتر NAA موجب بیش‌ترین طول ریشه در هر ریزنمونه شده است (۶). ساباتینی و همکاران (۳۱) گزارش کردند که تمایز آغازهای ریشه از سلول‌های پارانشیم فلوئم به نوع و غلظت اکسین مورد استفاده بستگی دارد. همچنین مشخص شده که سلول‌های تمایز یافته جهت پاسخ‌دهی به علائم و سیگنال‌های ارگانونمیک به نوع و غلظت مناسبی از اکسین نیاز دارند (۴). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که واکنش ریزنمونه‌های پپینو به کاربرد IBA نسبت NAA بیش‌تر بوده است. تجزیه نوری تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یکی از فاکتورهای مهم در کشت بافت می‌باشد؛ تجزیه نوری IBA بسیار کندتر از اکسین‌های دیگر از جمله IAA می‌باشد. حرکت کند IBA در داخل بافت و همچنین تخریب دیر هنگام آن را به عنوان دلایل اصلی کارایی بهتر IBA نسبت به دو اکسین NAA و IAA ذکر کرده‌اند (۴۱). همچنین تأثیرگذاری بیش‌تر IBA نسبت به NAA می‌تواند ناشی از تفاوت در حساسیت بافت گیاهی به نوع تنظیم‌کننده‌ی رشد باشد (۳۹). نتایج حاصل از سازگاری گیاهان نیز نشان داد که گیاهان کشت شده در سه محیط پیت+ماسه، پیت+پرلایت و پیت خالص به ترتیب درصد سازگاری ۹۱/۶۶، ۴۲/۸۶ و ۸۴/۳۷ درصدی نشان دادند که بیانگر برتری محیط کشت پیت+ماسه جهت سازگاری گیاهچه‌های پپینو نسبت به محیط‌های دیگر بوده است (شکل ۶).

در انتها شایان ذکر است، اگر بخواهیم گیاهان سالم و یکنواختی را با صرف وقت کمتر در حجم زیاد تولید کنیم روش کشت بافت بهترین گزینه می‌باشد، که با این روش خزانه‌ی ژنی این گیاه نیز در ایران حفظ خواهد شد. اما در سطح کم و تولید محدود، روش قلمه

همچنین پادماپیرا و همکاران (۲۳) با بررسی غلظت‌های مختلف IBA و 2-4-D بر ریشه‌دهی تاجریزی^۱ بیان کردند که هر چند هر دو نوع اکسین تأثیر مثبتی در القا ریشه داشتند ولی با این وجود IBA نسبت به 2-4-D بر ریشه‌زایی مؤثرتر بوده و بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی IBA تولید شده است.

نتایج پژوهش حاضر بیانگر مؤثرتر بودن کاربرد IBA نسبت به NAA بود که با نتایج گزارش شده در ریحان (۳۶) مبنی بر برتری محیط کشت MS غنی شده با ۲۰۳/۲۴ میلی‌گرم بر لیتر IBA نسبت به محیط‌های حاوی IAA یا NAA مطابقت دارد.

افزایش تعداد ریشه در اثر کاربرد IBA با نتایج گزارش شده در توت فرنگی (۳۳) و همچنین افزایش طول ریشه در نتیجه کاربرد IBA با نتایج گزارش شده در فلفل دلمه‌ای (۲۲) مطابقت دارد. IBA برای تحریک آغازش ریشه در کشت‌های درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (۲۴). به طوری که نتایج مطلوبی در نتیجه کاربرد IBA جهت ریشه‌زایی ریزنمونه‌های فلفل در محیط کشت پایه MS گزارش شده است (۱۵ و ۳۵). نتایج نشان داد که NAA تأثیر معنی‌داری بر کیفیت ریشه نداشته است که با نتایج گزارش شده در پپینو (۶) مبنی بر تولید با کیفیت‌ترین ریشه‌ها در اثر کاربرد غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA مطابقت ندارد.

در محیط MS تجهیز شده با سطوح مختلف NAA اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از صفات سرعت پرآوری، تعداد شاخه‌ها، طول شاخه، میزان ریشه‌دهی و کالوس‌دهی ریزنمونه پپینو مشاهده



شکل ۶- انتقال گیاهان ریشه دار شده در محیط کشت بافت به مخلوطهای خاکی (A)، گیاهان سازگار شده در گلدانهای حاوی پیت و ماسه (B)
Figure 6- (A) Transferring *in vitro* rooted plants to the soil mixtures, (B) Acclimatized plants in pots were filling with pit and sand

منابع

- 1- Ahmed M.B., Salahin M., Karim R., Razvy M.A., Hannan M.M., Sultana R., Hossain M., and Islam R. 2007. An efficient method for *in vitro* clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2: 121-125.
- 2- Atkinson R.G., and Gardner R.C. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of pepino and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports 10: 208-212.
- 3- Bermejo J.E.H., and León J. 1994. Neglected crops: 1492 from a different perspective (No. 26). Food and Agriculture Org.
- 4- Blakesley D., and Chaldecott M.A. 1997. The role of endogenous auxin in root initiation. Plant Growth Regulation 13: 77-84.
- 5- Blanca J.M., Prohens J., Anderson G.J., Zuriaga E., Cañizares J., and Nuez F. 2007. AFLP and DNA sequence variation in an Andean domesticate, pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): implications for evolution and domestication. American Journal of Botany 94: 1219-1229.
- 6- Cavusoglu A., and Sulusoglu M. 2013. In vitro propagation and acclimatization of pepino (*Solanum muricatum*). Journal of Food Agriculture Environment 11:410-415.
- 7- Contreras C., González-Agüero M., and Defilippi B.G. 2016. A review of pepino (*Solanum muricatum* Aiton) fruit: a quality perspective. HortScience 51: 1127-1133.
- 8- Devi C.S., and Srinivasan V.M. 2008. In vitro propagation of *Gymnema sylvestre*. Asian Journal of Plant Sciences 7: 660-665.
- 9- Emarah 2008. Factors affecting propagation of strawberry (*Fragaria* spp.) through tissue cultures. International Journal of Product Development 13: 191-212.
- 10- Gamburg K.Z., and Semenova L.A. 1977. Clonal propagation, flowering and fruiting of tomato *in vitro*. Acta Horticulture 447: 147-148.
- 11- Hadayat M., and Khoushkhoui M. 2006. Effects of culture media and growth regulators on micropropagation of pyrethrum [*Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir) Schultz-Bip.]. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 4: 171-182. (In Persian).
- 12- Hrbans L., Hankins A., Mebrahtu T., Mullins J., and Rangappa M. 1996. Alternative crops research in Virginia, Progress in new crops. ASHS press, P: 87-96.
- 13- Jordan M., Obando M., Iturriaga L., Goreux A., and Velozo J. 1993. Organogenesis and regeneration of some Andean fruit species. Acta Horticulturae 336: 279-283.
- 14- Kojori F., Kiani G., Nematzadeh G.A., and Ghasemi Y. 2015. Effects of different growth regulators on *in vitro* direct shoot regeneration of strawberry cv. diamante (*Fragaria x ananassa* Duch.). Journal of Crop Breeding 7: 68-75.
- 15- Mohamed M.H., and Alsadon A.A. 2011. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annum*. Biologia Plantarum, 55, p. 370.
- 16- Mohan L., Paraniharan V., and Murugesan R. 2000. New records - on pepino (*Solanum muricatum*). Indian Phytopathology 53: 495-497.

- 17- National Research Council. 1989. Lost crops of the incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington, DC: The National Academies Press.
- 18- Nordine A., Bousta D., El Khanchoufi A., and El Meskaoui A. 2013. An efficient and rapid in vitro propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region. International Journal of Pharma Bioscience and Technology 1: 118-129.
- 19- Nemati H., and Tehranifar A. 2007. Investigation of sexual and asexual propagation of a new vegetable called pepino in Iran (*Solanum muricatum*, Atio, pepino). Mashhad, Journal of Agricultural Science and Technology 21: 3-9. (In Persian)
- 20- O'Riordain F. 1987. The effects of benzyladenine, indole butyric acid and gibberellic acid on the micropropagation of the strawberry cultivar Clonard. In Vitro Culture of Strawberry Plants, pp. 47-53.
- 21- Otroshi M., and Karimi Dehkordi R. 2014. Effect of different concentrations of plant growth regulators on In vitro micropropagation of cherry tomato. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 5: 127-134.
- 22- Otroshi M., Moradi K., and Khayam Nekouei M. 2010. Micropropagation of *Capsicum annum* L. in vitro. Iranian Journal of Plant Biology 2: 1-12.
- 23- Padmapriya H., Karthikeyan A.V.P., Jahir Hussain G., Karthi C., and Velayutham P. 2011. An efficient protocol for in vitro propagation of *Solanum nigrum* L. from nodal explants. Journal of Agricultural Technology 7:1063-1073.
- 24- Pan R., and Zhao Z. 1994. Synergistic effects of plant growth retardants and IBA on the formation of adventitious roots in hypocotyl cuttings of mungbean. Plant Growth Regulation 14: 15-19.
- 25- Pauli R. 1988. Micropropagation of pepinos (*Solanum illucalul* Ait.). Acta Horticulturae 227: 387-389.
- 26- Pierik R.L.M. 1991. Horticulture new technologies and applications proceeding of the international seminar on new frontiers in horticulture. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 12: 141-53.
- 27- Pierik R.L.M. 1997. Micropropagation of *Solanum muricatum* Ait. (Pepino). In *High-Tech and Micropropagation V* (pp. 160-172). Springer, Berlin, Heidelberg. In Vitro Culture of Higher Plants. Springer Science and Business Media.
- 28- Prohens J., Rodríguez-Burruezo A., and Nuez F. 2005. Utilization of genetic resources for the introduction and adaptation of exotic vegetable crops: The case of pepino (*Solanum muricatum*, Ait.). Euphytica 146: 133-142.
- 29- Prohens J., and Nuez F. 1999. Strategies for breeding a new greenhouse crop, the pepino (*Solanum muricatum* Aiton). Canadian Journal of Plant Science 79: 269-275.
- 30- Prohens J., Ruiz J.J., and Nuez F. 1996. The pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): A "new" crop with a history. Economic Botany 50: 355-368.
- 31- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., and Scheres B. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. Cell 99: 463-472.
- 32- Sakamoto K., and Taguchi T. 1994. Somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and pepino (*Solanum muricatum*). In Somatic Hybridization in Crop Improvement I (pp. 244-254). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 33- Sakila S., Ahmed M.B., Roy U.K., Biswas M.K., Karim R., Razvy M.A., Hossain M., Islam R., and Hoque A. 2007. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) a newly introduced crop in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research 2: 151-154.
- 34- Sakamoto K., and Taguchi T. 1991. Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. Theoretical and Applied Genetics 81: 509-513.
- 35- Sanatombi K., and Sharma G.J. 2007. Micropropagation of *Capsicum annum* L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 35, p. 57.
- 36- Siddique I., and Anis M. 2008. An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. Acta Physiologiae Plantarum 30: 493-499.
- 37- Szyndel M.S., Kowalczyk K., and Pawelczak A. 2008. Elimination of tomato mosaic virus (ToMV) from pepino (*Solanum muricatum*) plants. Phytopathologia Polonica 49: 57-63.
- 38- Tilkat E., Onay A., Yildirim H., and Cetin Ozen H. 2008. Micropropagation of mature male pistachio *Pistacia vera* L. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 83: 328-333.
- 39- Trewavas A.J., and Cleland R.E. 1983. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? Trends in Biochemical Sciences 8: 354-357.
- 40- Yildiz T., and Kalkan F. 2014. Some color and physical properties of pepino (*Solanum Muricatum* Aiton) fruit. Bulgarian Journal of Agricultural Science 20: 988-992.
- 41- Zarei M., Garoosi Gh., Nezami E., Hosseini R., and Ahmadi J. 2013. The effect of medium, carbon source, light spectrum and style treatment of auxin on shoot and root regeneration of Gisela 6 root stock. Journal of Cell and Tissue 4: 169-185.



Effect of Medium and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) in vitro Condition

M. Aghdaei¹- S.H. Nemati^{2*}- L. Samiei³- A. Sharifi⁴

Received: 09-12-2018

Accepted: 22-09-2019

Introduction: Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) is a diploid herbaceous plant belongs to the Solanaceae family, which is growing in subtropical zone, originates from Andes in South America. It is commercially grown for its fruit, which is appreciated not only for food but also for its appearance, in South American countries, including Bolivia, Colombia, Ecuador and Peru, as well as in countries such as New Zealand and Australia. Pepino is propagated by seed, cutting, and tissue culture methods. Most pepino cultivars are sexually fertile and produce viable seeds, but their seeds have poor germination and high level of heterozygosis causing to highly variable plants. Both mentioned negative aspects have limited the mass production of this plant through seed. In this case, stem cutting is used as the most common way of propagating pepino led to transmission of viral diseases and increasing propagation costs as two main limiting factors of pepino propagation. So, micropropagation systems are a promising tool to produce disease-free clonal plant material with low costs. Therefore, the present study was aimed to assess the effect of different media and plant growth regulators on micropropagation traits of pepino.

Materials and Methods: Three separate experiments were carried out in institute of plant sciences of Ferdowsi University of Mashhad in 2016. Pepino seeds were bought from company of Plant World Seed, UK, were cultivated on MS medium. Grown plants were used as source of providing explants. Four mediums, including MS, ½ MS, SH and B5 were used to determine the best culture medium for shoot regeneration of pepino using single node explant. A factorial experiment was conducted based on a completely randomized design. Some growth properties such as number of shoots, shoot length, number of roots, root length, leaf number and leaf length were evaluated after two and four weeks. In proliferation experiment, MS medium was compared with MS supplemented with different concentrations of BA (0.5, 1 and 2 mg L⁻¹) and Kin (0.5, 1 and 2 mg L⁻¹) applied as combined treatments, and also BA used alone at concentrations of 2, 4 and 6 mg L⁻¹ that was conducted based on a completely randomized design. For rooting of explants, an experiment was conducted based on a completely randomized design containing of two concentrations of IBA (at 0.3 and 0.6 mg L⁻¹) and three concentrations of NAA (at 0.3, 0.6 and 0.9 mg L⁻¹) in MS medium. Some growth properties including root number and length, root density and root quality were evaluated after four weeks

Results and Discussion: Results indicated that micropropagation rate of pepino was affected by culture medium type. The highest shoot length, number of root, root length and leaf number were obtained in MS medium, although statistically there was no significant difference between MS and ½ MS media. The highest number of shoots and leaf length were observed in MS medium, which led to a significant difference with other media (½ MS, SH and B5). Overall, Based on obtained results MS medium was the best culture medium for micropropagation of pepino using single node. In the proliferation experiment, the highest shoot and leaf number and plant color were obtained with using 2 mg L⁻¹ BA + 1 mg L⁻¹ Kin, whereas the highest shoot length and leaf length were observed in the 1 mg L⁻¹ BA + 2 mg L⁻¹ Kin and 1 mg L⁻¹ BA+1 mg L⁻¹ Kin treatments, respectively. Increasing in concentration of BA up to 2 mg L⁻¹ in combination with Kin had a positive effect on shoot proliferation, while applying BA at concentration 2, 4 and 6 mg L⁻¹ alone led to decrease in proliferation. Results obtained from rooting experiment showed that the highest root number, root density and root quality were obtained using IBA at the concentration of 0.6 mg L⁻¹, whereas the highest root length was observed by applying IBA at concentration of 0.3 mg L⁻¹, which led to a significant difference with other treatments. Furthermore,

1 and 2- Ph.D. Graduate and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

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

3- Department of Ornamental Plants, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Iran

results indicated that the effect of IBA on rooting of pepino microshoots was more than NAA.

Conclusion: Generally, the best results were obtained by MS medium, 2 mg L⁻¹ BA with 1 mg L⁻¹ Kin for shoot proliferation, and IBA at concentration of 0.6 mg L⁻¹ for the rooting of pepino nodal segments.

Keywords: BA, IBA, Proliferation, Rooting, Tissue culture



بررسی تنوع ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی، و تجزیه علیت عملکرد سوخ و میزان آلیسین توده های محلی سیر ایرانی در منطقه همدان

محمد حسین عالم خورام^۱ - امیرحسین کشت‌کار^{۲*} - اصغر میرزایی اصل^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸

چکیده

سیر ایران از کیفیت عطر و طعم خوبی برخوردار است، ولی تا به امروز به جز رقم مازند که مناسب مازندران است، رقم بومی دیگری از سیر اصلاح و معرفی نشده است. به منظور شناسایی پربازده‌ترین توده‌های محلی برای اصلاح و معرفی رقم مناسب شرایط آب و هوایی همدان، در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ آزمایشی بر روی ۱۸ توده محلی مختلف در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مرکز تحقیقات کشاورزی همدان اجرا شد. نه توده از مناطق کشت سیر استان همدان و نه توده از سایر استان‌های سیرکار کشور انتخاب گردیدند. توده‌های محلی از نظر ۳۳ صفت مهم زراعی - مورفولوژیکی از جمله عملکرد سوخ؛ و میزان اسید پیروویک کل (مجموع اسید پیروویک حاصل از فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی)، میزان اسید پیروویک غیرآنزیمی، میزان اسید پیروویک آنزیمی و میزان آلیسین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که صفات مورد بررسی توده‌های محلی کشور از تنوع بالایی برخوردارند که لازمه برنامه‌های اصلاحی است و همچنین معرفی توده‌ها به مناطق دیگر می‌تواند با نتایج مطلوب همراه باشد. چنانکه از نه توده محلی غیر بومی همدان سه توده محلی ارومیه، اراک و بردسیر کرمان در شرایط آب و هوایی همدان تولید قابل قبول داشتند. توده‌های محلی ارومیه، سولان و حیدره بر اساس عملکرد سوخ، اسید پیروویک آنزیمی و رابطه مولی دو به یک آن با آلیسین بیشترین ماده عطر و طعم - دهنده آلیسین را در هکتار تولید کردند. صفات وزن سوخ به طور مستقیم و قطر یقه به طور غیرمستقیم از طریق وزن سوخ، با عملکرد سوخ و صفات شاخص سطح برگ، شاخص برداشت، وزن خشک برگ بوته و قطر سوخ با میزان آلیسین تولیدی ارتباط معنی‌دار بالایی نشان دادند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای توده‌ها به دو گروه اصلی مناسب و نامناسب کشت در همدان تقسیم شده که گروه مناسب کشت در همدان خود به چهار زیرگروه سه تایی تقسیم شد. خوشه‌بندی امکان کاهش هزینه‌های حفظ منابع ژنتیکی سیر را با کم کردن میزان مواد نگهداری شده با حداقل افت تنوع صفات، فراهم می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: اسید پیروویک، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، رگرسیون گام به گام، سیر

مقدمه

عملکرد ۱۰ تن در هکتار است. در حالی که متوسط عملکرد جهانی سیر ۱۷ تن در هکتار و متوسط عملکرد در کشور ازبکستان ۳۹ تن در هکتار می‌باشد (۱۴). ترکیب‌های گوگردی سیر سبب عطر و طعم و خواص دارویی و آنتی بیوتیکی آن است (۵). پیش‌ماده عطر و طعم دهنده سیر آلیسین^۴ ($C_6H_{11}NO_3S$) با وزن ملکولی ۱۷۷/۲۲ گرم بر مول است که ظرف چند دقیقه دو مول آن تحت تاثیر آنزیم آلیناز، یک مول آلیسین ($C_6H_{10}OS_2$) با وزن ملکولی ۱۶۲/۲۶ گرم بر مول، دو مول اسید پیروویک ($C_3H_4O_3$) و دو مول آمونیاک (NH_3) تولید می‌کند (۳۲). یک میلی گرم آلیسین معادل ۰/۴۵۸ میلی گرم آلیسین است. به منظور استفاده تجاری و اقتصادی از سیر مقدار آلیسین سیر و

سیر بومی مناطق مرکزی آسیا می‌باشد (۱۹) و قریب به ۳۰۰۰ سال پیش اهلی شده است (۲۹). طی یک دوره ۲۴ ساله (۲۰۱۳ - ۱۹۸۹) تولید و مصرف جهانی سیر به چهار برابر افزایش یافته است (۱۴). سطح زیر کشت این گیاه در کشور حدود ۹۰۰۰ هکتار با متوسط

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، گروه آموزشی زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

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

۳- دانشیار گروه آموزشی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

فرآورده‌های آن نباید کمتر از ۴/۵ میلی گرم در گرم وزن تر (۰/۴۵ درصد) باشد (۱۳) که این مقدار معادل ۵۵/۴۷ میکرومول اسید پیروویک بر گرم سیر تازه است.

مهم‌ترین عامل پایین بودن و عدم رشد تولید داخلی، نبود ارقام اصلاح شده است. تنها رقم سیر ایرانی در سال ۱۳۸۱ به نام مازند به ثبت رسیده است. عملکرد متوسط، تولید کل و تعداد ارقام جدید سیر در مقیاس جهانی در حال افزایش است (۸). سیر زراعی کاملاً عقیم است (۲۳)، و تکثیر آن به روش غیر جنسی و وقوع تنوع در آن به جهش‌های تصادفی، القایی و تنوع سوماکلونال محدود می‌شود. ارقام زراعی جدید سیر تنها از طریق انتخات، از بین تنوع موجود تولید می‌شوند (۲۳). سال‌های طولانی کشت و کار توده‌های بومی سیر در کشور موجب تجمع جهش‌های تصادفی شده است. این تنوع موجود در توده‌های محلی واجد پتانسیل باارزشی است که با استفاده از روش‌های علمی اصلاح می‌توان رقم (ارقام) واجد عملکرد کمی (تولید در هکتار) و کیفی (درصد آلیسین) برتر تولید نمود.

اولین قدم در هر برنامه اصلاحی جمع‌آوری ژرم پلاسما گیاهی با تنوع ژنتیکی می‌باشد که انتخاب مناسب از داخل آن صورت می‌گیرد. تکثیر سیر غیرجنسی است. خصوصیات مورفولوژیکی سوخ‌ها، تعداد و اندازه برگ‌ها، ارتفاع ساقه گل‌دهنده، تعداد پوسته‌های سوخ، واکنش به دما، خواب سوخ، کیفیت نگهداری و طول دوره رویشی و رسیدگی به طور ژنتیکی کنترل می‌شوند و این صفات پلی‌ژنتیک هستند (۱۸). وراثت پذیری صفات تعداد سیرچه (حبه) در سوخ و وزن سیرچه بالا است. با مطالعه تنوع ژنتیکی و همبستگی صفات، سیرهای تیپ سفید آرژانتینی به سه دسته با عملکرد زیاد، متوسط و پایین گروه بندی شده‌اند (۲۵). در داخل کلون‌های سیر برای زمان سوخ‌دهی تنوع فنوتیپی و برای دوره نوری و درجه حرارت تنوع ژنتیکی بالایی مشاهده شده است (۱۰). از نظر دوره خواب بین کلون‌ها اختلاف زیادی گزارش شده است و کلون‌هایی که از چرخه زندگی کوتاه‌تری برخوردارند عملکردشان پایین است (۱۵). کاشت سیرچه‌های درشت نه تنها در افزایش عملکرد بلکه روی کیفیت سیر هم تأثیر مثبت دارد (۲۲).

برای اندازه‌گیری ترکیب‌های عطر و طعم دهنده سیر، می‌توان آلیسین را بطور مستقیم با روش‌های کروماتوگرافی؛ و یا غیرمستقیم، اسید پیروویک آنزیمی را که ناشی از تجزیه آنزیمی ترکیب‌های عطر و طعم دهنده سیر است، به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری نمود. اسید پیروویک با ترکیب‌های عطر و طعم دهنده سیر همبستگی بالایی دارد (۳۵).

در بررسی اثر وزن سیرچه‌های بذری روی مقدار پیرووات آنزیمی در دو توده محلی سیر همدان (توده‌های علی‌آباد و حیدره)، مشخص شده است که با افزایش وزن سیرچه‌های بذری، مقدار ترکیب‌های عطر و طعم دهنده افزایش می‌یابد، به طوری که با انتخاب و کاشت

سیرچه‌های بذری بزرگ‌تر از چهار گرم، می‌توان مقدار ترکیب‌های عطر و طعم دهنده را در واحد سطح مزرعه افزایش داد (۴). در مطالعه ۲۰۰ نمونه سیر از قسمت شرقی استرالیا، مقدار آلیسین در محدوده نیم تا نه میلی گرم بر گرم وزن تر ارزیابی شده است و مقدار آلیسین ۵۰ درصد نمونه‌ها بالاتر از حد دارویی قرار داشت (۱۱). قبل از این مطالعه بالاترین مقدار آلیسین متعلق به رقم‌های رومانی‌رد^۱ از نیویورک (۲۱) و اسپانیس رخه^۲ از آمریکا و لائوتوکسو^۳ از چین (۲۴) به ترتیب با ۷/۷، ۷/۶ و ۶/۶ میلی گرم در گرم وزن تر بوده است (۷). در مطالعه واریته‌های سیر آرژانتینی اختلاف مقادیر آلیسین معنی‌دار گزارش شده است (۲۸). در این مطالعه به منظور شناسایی و انتخاب پربازده‌ترین توده‌های محلی سیر جهت اصلاح و معرفی رقم یا ارقام مناسب کشت در منطقه همدان، ۱۸ توده محلی سیر از نظر صفات زراعی و مورفولوژیکی مختلف از جمله عملکرد سوخ؛ میزان اسید پیروویک کل، میزان اسید پیروویک آنزیمی، میزان اسید پیروویک غیر آنزیمی و میزان آلیسین مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵ در مرکز تحقیقات کشاورزی همدان واقع در ۶ کیلومتری شمال شهر همدان با مشخصات ۱۷۴۰ متر از سطح دریا و طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۵۲ دقیقه شرقی و عرض ۳۴ درجه و ۵۲ دقیقه شمالی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. بافت خاک محل آزمایش با ۲۴/۴، ۴۰/۶ و ۳۵ درصد به ترتیب رس، لای و شن لومی بود. عملیات خاک‌ورزی شامل شخم با گاوآهن برگرداندار، دیسک، ماله و ایجاد جوی و پشته به عرض ۵۰ سانتی‌متر بود. نه توده محلی همدان شامل مناطق مریانج، بهار، شورین، سولان، تویسرکان، حیدره، توئین، حسین‌آباد و علی‌آباد؛ و نه توده محلی از نه استان دیگر، شامل گرگان (گلستان)، ارومیه (آذربایجان غربی)، اراک (مرکزی)، بردسیر (کرمان)، آمل (مازندران)، رامهرمز (خوزستان)، اصفهان (اصفهان)، طارم (زنجان) و زابل (سیستان) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل‌های ۱ و ۲). هر کرت آزمایشی شامل دو پشته چهار متری با دو ردیف کاشت روی هر پشته بود. فاصله ردیف‌ها روی پشته از هم ۲۵ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها از هم روی خطوط کشت ۱۰ سانتی‌متر بود (تراکم ۴۰ بوته در متر مربع). کشت در تاریخ ۲۶ آبان انجام شد و در ۲۷ و ۲۸ آبان به ترتیب با ۱۹ و ۹/۹ میلی‌متر بارش اولین آبیاری انجام و در طول فصل پاییز و زمستان کلیه نیاز آبی از طریق نزولات

1- Romanian Red

2- Spanish Roja

3- Laotouxu

برای غیرفعال کردن آنزیم آلیناز جهت تعیین پیرووات غیرآنزیمی حبه‌های سیر در ابتدا در نمونه‌های ۴۰ تا ۶۰ گرمی توسط ماکروفر به ازای هر گرم وزن نمونه سه ثانیه (۱۲۰ تا ۱۸۰ ثانیه) تیمار حرارتی با توان ۹۰۰ وات شدند.

جهت پی بردن به ارتباط بین متغیرها، ضرایب همبستگی بین آنها محاسبه شد. بررسی روابط بین صفات با عملکرد سوخ و آلئسین توسط روش رگرسیون گام به گام انجام گرفت. روابط علت و معلولی، و اثرات مستقیم و غیر مستقیم صفات بر روی عملکرد سوخ و آلئسین با تجزیه علیت مشخص گردید.

تجزیه واریانس، مقایسه میانگین صفات (روش LSD در سطح احتمال یک درصد)، تعیین همبستگی‌ها و تجزیه رگرسیون گام به گام و تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار Minitab نسخه‌های ۱۷،۳،۱ و ۱۹،۱، تجزیه علیت با صفحه‌گستر Excel نسخه ۲۰۰۳ و رسم گراف‌ها با Word نسخه ۲۰۰۳ انجام شد.

نتایج و بحث

کلیه صفات به غیر از تعداد بوته در هکتار در سطح احتمال یک درصد اختلاف خیلی معنی‌داری نشان دادند (جدول ۱). مقایسه میانگین (جدول ۲) کلیه صفات را در تعداد گروه‌های قابل توجهی گروه‌بندی نمود که تاییدی بر وجود تنوع بالای موجود در توده‌های محلی سیر ایرانی است. تنوع بالا در توده‌های محلی سیر توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۱۲، ۳۳ و ۳۴). ضریب تغییرات، و حداکثر و حداقل صفات به ترتیب در جداول ۱ و ۲ با قلم ضخیم مشخص شده‌اند.

جمع‌آوری گسترده، ارزیابی و حفظ تنوع که اولین قدم در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد، لازم الاجراست. این امر در جمهوری چک از سال ۱۹۵۱ آغاز شده است و اکنون ژرم‌پلاسم آن‌ها شامل ۶۱۳ ژنوتیپ است (۳۱). چینی‌ها ژرم پلاسمی شامل ۱۴۸ نمونه سیر دارند که از مناطق با شرایط آب و هوایی متنوع جمع‌آوری و یا با انجام گزینش‌های طبیعی و مصنوعی تهیه شده‌اند (۳۶). در بلغارستان ژرم پلاسم سیرهای فاقد ساقه‌ی گل‌دهنده نگهداری می‌شود (۹).

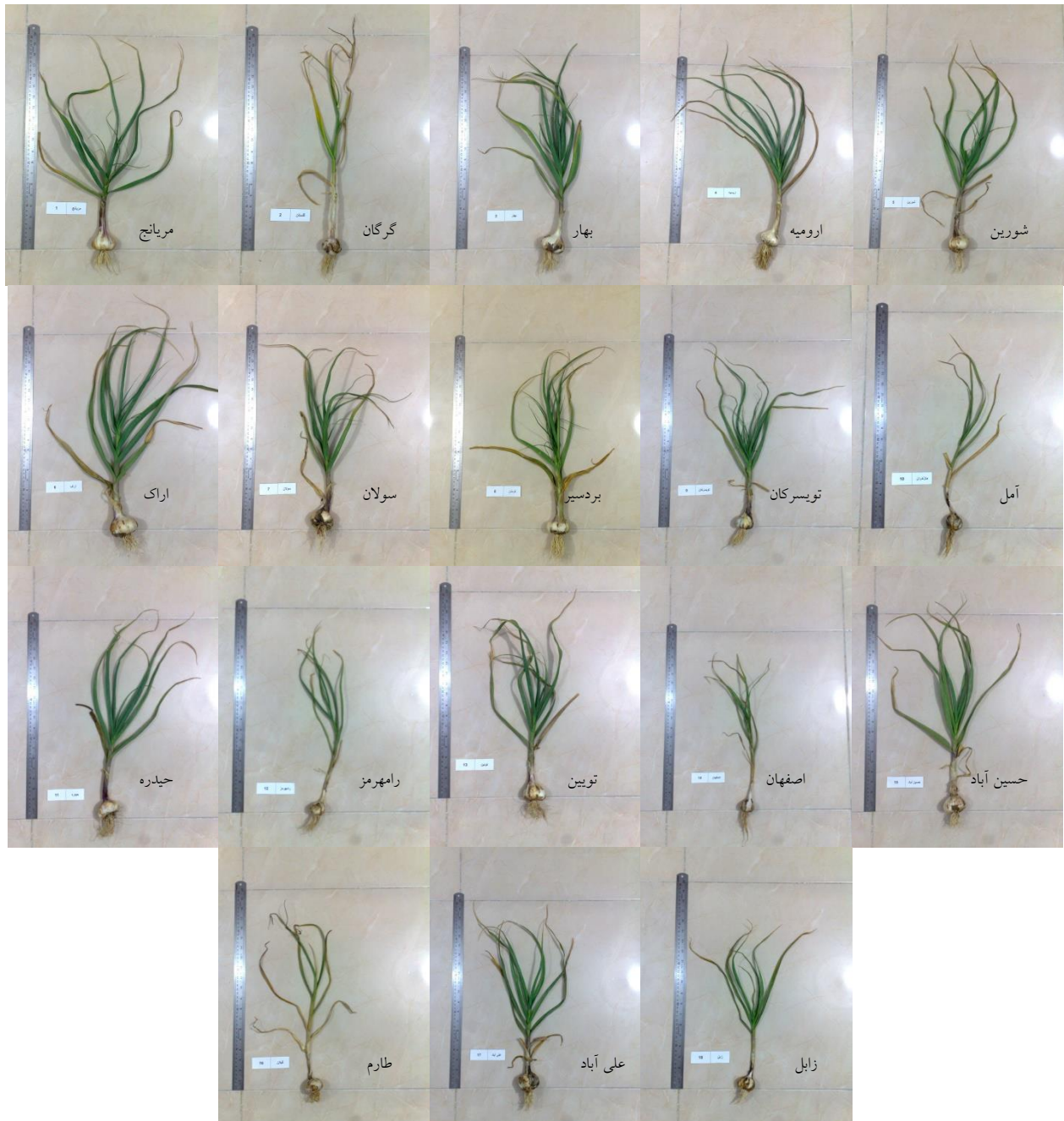
مهم‌ترین صفات اقتصادی عملکرد سوخ (صفت کمی) و میزان آلئسین (صفت کیفی) می‌باشند. محتوای مولی آلئسین نصف محتوای مولی اسید پیروویک آنزیمی در سیر است (۳۲). توده محلی سولان با ۱۲۰۹۰ و توده محلی رامهرمز با ۲۰۵۹ کیلوگرم در هکتار به ترتیب بیشترین و کمترین عملکرد سوخ را تولید کردند. بهبود ژنتیکی توده‌ها و تولید و تکثیر ارقام پربازده بین زارعین از اهمیت فراوانی برخوردار است. دو دهه قبل فقط دو توده محلی (قرمز و سفید) با تنوع ژنتیکی

جوی تامین شد. توده‌های مختلف از تاریخ ۲۱ تا ۲۵ اسفند سبز شدند. با شروع فصل بهار و رویش مجدد سیستم آبیاری تحت فشار تیپ در مزرعه نصب و بسته به شدت گرمای هوا هر هفت تا ۱۰ روز یک بار تا ۱۵ خرداد مزرعه آبیاری شد. برداشت توده‌های مختلف از ۴ تیر تا ۱۵ تیر به صورت دستی انجام شد. صفات مورد ارزیابی کورت عبارت بودند از: وزن ۳۰ سیرچه (حبه) بذری، تاریخ سبز شدن و رسیدگی، تعداد بوته در هر کرت، میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئیدهای برگ به روش آزمایشگاهی (۲) و شاخص کلروفیل کل با دستگاه SPAD، محتوای نسبی آب برگ RWC (۳۰)، عملکرد سوخ، وزن ۳۰ حبه تولید شده، اسید پیروویک کل و غیرآنزیمی (۲۰)، و صفات مورد ارزیابی پنج بوته تصادفی نرمال (بوته سالمی که در دو طرف آن روی خط کشت و در نقاط مقابل بر روی خطوط کشت مجاور بوته سالم باشد) از هر کرت عبارت بودند از: ارتفاع، قطر یقه و تعداد برگ موجود و افتاده، طول و عرض و سطح برگ، وزن خشک برگ‌ها و ریشه (به شعاع پنج سانتی‌متر اطراف سوخ) بوته، ارتفاع و طول و عرض و وزن سوخ، وزن ماده خشک سوخ، تعداد پوسته، تعداد و وزن سیرچه، درصد ماده خشک (۲۶). صفاتی که بر اساس محاسبات بر روی صفات اندازه‌گیری شده بدست آمدند عبارت بودند از: درصد رطوبت سوخ، شاخص سطح برگ، مجموع کلروفیل a و b و کل، درصد افت وزنی حبه کردن، شاخص برداشت، ضریب کروی^۱ سوخ، تعداد کل برگ بوته، تعداد روز از سبز شدن تا رسیدگی، اسید پیروویک آنزیمی و آلئسین. اندازه‌گیری‌ها صفات طبق "توصیف‌نامه گونه‌های جنس آلیوم" (۱۶) ارزیابی شدند. برای اندازه‌گیری اسید پیروویک ۲۵ گرم حبه با ۲۵ میلی‌لیتر آب به طور یکنواخت مخلوط و پس از ده دقیقه از کاغذ صافی عبور داده شد. ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده به نیم میلی‌لیتر از عصاره صاف و رقیق شده ۱/۵ میلی‌لیتر محلول پنج درصد تری کلرواستیک اسید^۲ و پس از یک ساعت ۱۸ میلی‌لیتر آب افزوده شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول حاصل را به لوله آزمایش منتقل کرده (یک میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد نیز به لوله‌های آزمایش جداگانه منتقل شد)، یک میلی‌لیتر آب و یک میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین^۳ ۰/۰۱۲۵٪ به هر یک از آنها افزوده برای مدت ده دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در پایان با افزودن پنج میلی‌لیتر سود ۰/۰۶ نرمال به لوله‌های آزمایش در حضور محلول‌های استاندارد ۰/۰۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکرومول بر میلی‌لیتر پیرووات سدیم، غلظت نمونه‌های آزمایشی در طول موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا بیوتک^۴ مدل نوواسپک ۵۲ اندازه‌گیری شد.

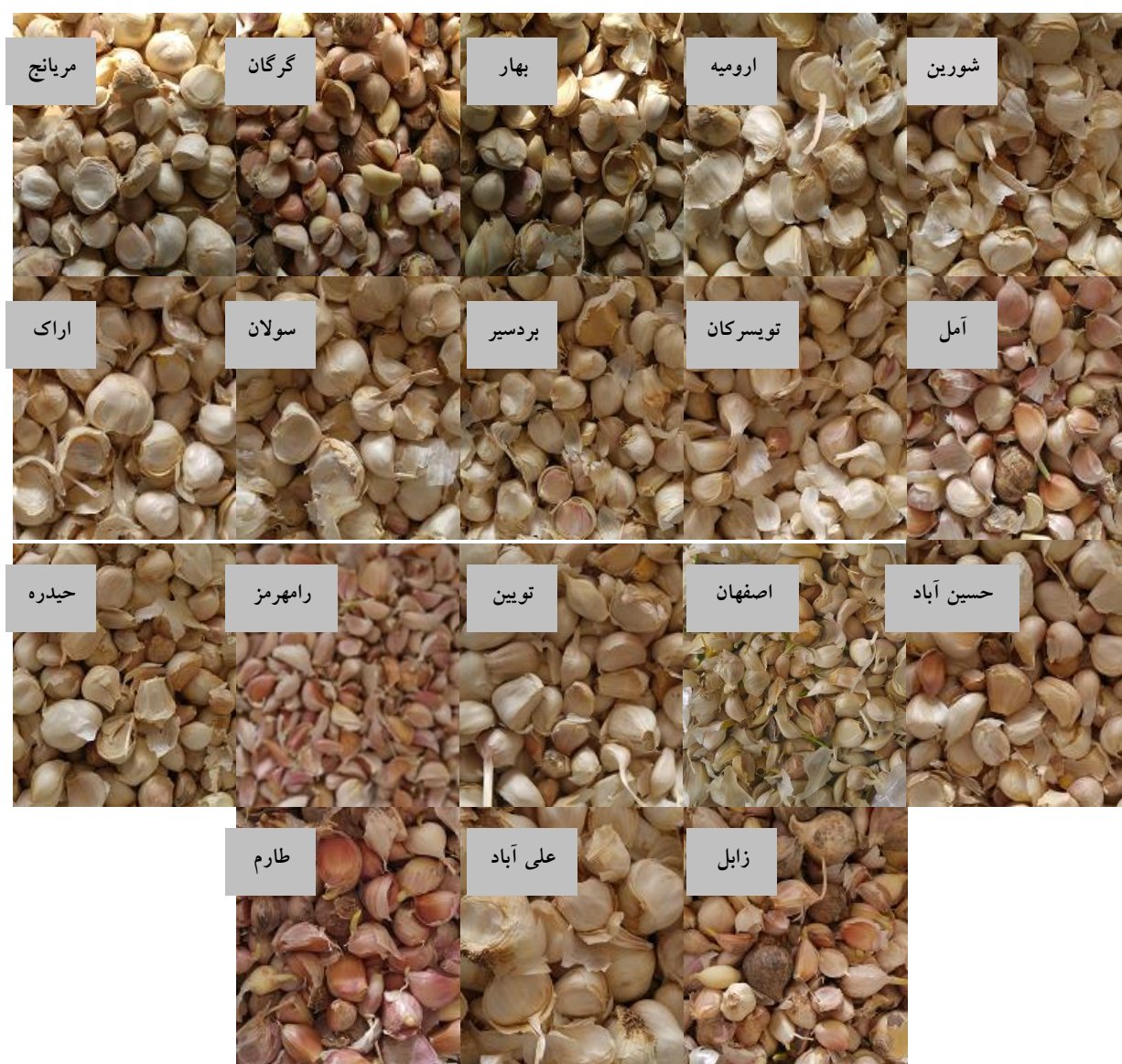
- 1- Sphericity Coefficient
- 2- Tricholoro acetic acid
- 3- Dinetrophenyl hydrazine (DNPH)
- 4- Pharmacia biotech

کرده‌اند (۶). توده‌های محلی ارومیه، مریانج و علی‌آباد به ترتیب با ۵۷/۰۱، ۵۶/۳۵ و ۵۵/۳۹ میکرو مول بر گرم سیر تازه بیشترین اسید پیروویک آنزیمی را دارند و از لحاظ دارویی اندکی بیشتر از حد دارویی آلیسین تولید می‌کنند.

زیاد از تولیدات مهم آرژانتین بوده است ولی در حال حاضر ۱۲ کلون از ۵ نوع تجارتی سیر در این کشور اصلاح و سازگار شده‌اند. همه این کلون‌ها که نیازمند دمای معتدل یا سرد هستند، ۳۰ تا ۵۰ درصد بیشتر از توده‌های محلی عملکرد دارند و بازار خارجی گسترده‌ای پیدا



شکل ۱- بوته کامل ۱۸ توده بومی سیر ایرانی
Figure 1- Complete plant of 18 landraces of Iranian garlic



شکل ۲- حبه بذری ۱۸ توده بومی سیر ایرانی
Figure 2- Seed clove of 18 landraces of Iranian garlic

آلیسین تولیدی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به طوری که با استفاده از مکمل‌های غذایی، مقدار آلیسین تا ۳۵ درصد در طی رشد گیاه افزایش می‌یابد (۱۱). عملیات پس از برداشت سیر نیز در حفظ یا افت ترکیب‌های عطر و طعم دهنده سیر اثر دارد. همچنین میزان اسید پیروویک اندازه‌گیری شده رابطه مستقیم با فاصله زمانی برداشت تا انجام آزمایش دارد و با شروع جوانه‌زنی این مقدار کاهش معنی‌داری می‌یابد. بنابراین اختلاف نتایج در این تحقیق با نتایج سایر محققین می‌تواند مربوط به اثرات محیطی یا اختلاف ژنتیکی توده‌های مورد بررسی علیرغم نام مشترک یا فاصله زمانی متفاوت بین برداشت مزرعه تا انجام آزمایش و یا ترکیبی از همه این موارد باشد (۱۱).

ولی مقدار آلیسین سایر توده‌ها پایین‌تر از حد دارویی قرار گرفتند. توده محلی اصفهان با ۳۱ میکرومول بر گرم سیر تازه کمترین اسید پیروویک آنزیمی و در نتیجه آلیسین را تولید نمود. در این تحقیق برخلاف نتایج بعضی از محققان (۳، ۲۷ و ۱) اکثر توده‌های محلی در محدوده دارویی قرار نگرفتند. در بررسی ده اکوتیپ سیر همدانی (۱) مقدار اسید پیروویک کل در توده‌های شورین و توپین بالای ۸۰؛ برفچین، موئین، علی‌آباد، بهار و سولان بین ۷۵ تا ۸۰ و توده‌های محلی توپسرکان، مریانج و حیدره کمتر از ۷۵ میکرومول بر گرم سیر تازه بدست آمد. مقدار آلیسین در ارقام و توده‌های سیر به عوامل مهمی مانند سازگاری ژنتیکی هر رقم یا توده با منطقه‌ای که در آن رشد می‌کند، بستگی دارد. مدیریت مزرعه و عوامل تغذیه‌ای هم مقدار

جدول ۱- میانگین مربعات صفات

Table 1- Mean square of traits

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f.	تعداد بوته در کرت Number of plant / plot	وزن ۳۰ جبه Weight of 30 seed clove	عملکرد Yield	وزن سبوس تر Weight of fresh bulb	وزن سبوس خشک شده Weight of dried bulb	درصد رطوبت سبوس Bulb moisture (%)	شاخص سطح برگ LAI	کلوفیل a Chlorophyll a	کلوفیل b Chlorophyll b	کلوفیل کل Total Chlorophyll	کاروتنوئیدها Carotenoids
بلوک Block	3	8.161	ns	**	1.83	2.59	0.00073	0.025	0.00005	0.00077	ns	0.0018
توده محلی Landrace	17	26.46	**	**	503.29	61.06	0.0048	1.44	0.0018	0.0048	**	0.0025
خطا Error	51	28.84	152.88	386460	8.12	1.46	0.0004	0.008	0.000062	0.00023	0.00035	0.00022
ضرب تغییرات CV (%)	-	3.59	11.24	6.53	7.63	8.43	1.80	6.97	0.95	4.81	1.64	1.50
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f.	رنگدانه کل Total pigment	شاخص اسپد SPAD index	درصد افت وزنی جبه کردن %Loss weight of cuddle	وزن ۳۰ جبه تولید شده Weight of 30 clove produced	وزن خشک برگ بوته Dry weight of plant leaf	وزن خشک ریشه بوته Dry weight of plant root	شاخص برداشت سبوس Bulb HI	قطر سبوس Bulb diameter	طول سبوس Bulb length	ضریب کرویت Sphericity coefficient	عرض سبوس Bulb width
بلوک Block	3	0.028	ns	0.00003	68.08	0.44	0.0029	11.33	0.82	1.31	0.000083	8.24
توده محلی Landrace	17	0.0204	**	0.0046	7395.19	8.72	0.055	59.34	24.05	287.97	0.0067	153.42
خطا Error	51	0.00073	3.63	0.000093	69.96	0.054	0.0009	3.7	0.86	4.42	0.0004	2.56
ضرب تغییرات CV (%)	-	1.27	3.34	11.08	7.07	5.82	10.56	2.48	2.89	4.02	2.52	3.57

ns و * به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد
ns, * and ** non- significant, significant at the 5% and 1% levels of probability, respectively.

جدول ۱- میانگین مربعات صفات (ادامه)

Table 1- Mean square of traits (continued)

S.O.V منابع تغییرات	درجه آزادی d.f.	تعداد لایه Number of layer	تعداد جبهه Number of clove	وزن جبهه Weight of clove	قطر یقه Diameter crown	ارتفاع گیاه Height plant	تعداد برگ سبز Number of leaf	تعداد برگ افتاده Leaf number of fallen	تعداد کل برگ Leaf total	تعداد روز تا سبز شدن Days to germination	تعداد روز تا رسیدگی Days to maturity	تعداد روز از سبز شدن تا رسیدگی Days from germination to maturity
بلوک Block	3	0.069 ^{ns}	0.2 ^{ns}	0.28 ^{ns}	2.01 ^{ns}	10.38 ^{ns}	2.49 ^{**}	0.17 ^{**}	2.5 ^{**}	0.54 ^{ns}	6.29 ^{**}	3.95 [*]
توده محلی Landrace	17	1.73 ^{**}	10.44 ^{**}	11.06 ^{**}	69.89 ^{**}	66.72 ^{**}	6.91 ^{**}	0.84 ^{**}	4.81 ^{**}	3.44 ^{**}	68.01 ^{**}	68.04 ^{**}
خطا Error	51	0.038	0.29	0.3	0.78	5.18	0.31	0.038	0.37	0.35	0.72	1.22
ضریب تغییرات CV (%)	-	5.55	7.21	11.42	6.59	3.47	6.89	12.13	6.28	0.51	0.38	1.00
S.O.V منابع تغییرات	درجه آزادی d.f.	برگ RWC رطوبت نسبی مجموعی										
بلوک Block	3	1.11 ^{ns}										
توده محلی Landrace	17	41.48 ^{**}										
خطا Error	51	2.29										
ضریب تغییرات CV (%)	-	2.26										
بلوک Block	2	4.12 ^{ns}	2	ns	4.12 ^{ns}	0.0256 ^{ns}	3.59 ^{ns}	176.21 ^{**}				
توده محلی Landrace	17	152.39 ^{**}	17	**	152.39 ^{**}	0.23 ^{**}	146.07 ^{**}	523.89 ^{**}				
خطا Error	34	2.263	34		2.263	0.013	2.309	8.96				
ضریب تغییرات CV (%)	-	3.128	-		3.128	9.326	3.082	7.84				

ns و * و ** به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

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

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات
Table 2- Mean comparison of traits

صفت Trait	وزن ۳۰ حبه بذری Clove Seed weight of 30 (g)	عملکرد Yield (kg/ha)	وزن ساقه تازه Bulb weight of fresh (g)	وزن ساقه خشک شده Bulb weight of dry (g)	رطوبت ساقه Moisture bulb (%)	شاخص سطح برگ LAI	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g)	رنگدانه کل Total pigment (mg/g)	شاخص اسپد SPAD index
1- مریانج	122 ^{ef}	10861 ^{bde}	45 ^{abcd}	16.9 ^{abcd}	63 ^{abc}	1.5 ^{de}	0.82 ^{figh}	0.31 ^{efg}	0.98 ^{bde}	1.13 ^{de}	2.1 ^{de}	61 ^{ab}
2 - Gorgan	64 ^{gh}	7459 ^f	29 ^{fg}	10.5 ^h	64 ^a	0.55 ^f	0.81 ^{hi}	0.28 ^h	1.00 ^{abc}	1.008 ^f	2.1 ^{ef}	52 ^{hi}
3 - Bahar	142 ^{bde}	11165 ^{abcd}	48 ^{ab}	18.2 ^{ab}	62 ^{abc}	1.8 ^{abc}	0.84 ^{cde}	0.36 ^{ab}	1.01 ^{ab}	1.20 ^{ab}	2.2 ^{ab}	59 ^{bde}
4 - Oromyeh	124 ^{ef}	10866 ^{bde}	42 ^{cde}	16 ^{bde}	61 ^{bc}	1.6 ^{cd}	0.86 ^a	0.37 ^a	1.01 ^a	1.23 ^a	2.2 ^a	63 ^a
5 - Sheverin	124 ^{ef}	11685 ^{abc}	41 ^{de}	15.3 ^{def}	63 ^{ab}	1.7 ^{cd}	0.85 ^{def}	0.36 ^{ab}	1.00 ^{abc}	1.19 ^b	2.2 ^{ab}	58 ^{bde}
6 - Arak	113 ^f	9941 ^e	43 ^{bde}	15.9 ^{cde}	63 ^{abc}	1.8 ^{ab}	0.84 ^{bde}	0.33 ^{cde}	1.00 ^{abc}	1.16 ^{bc}	2.2 ^{cd}	57 ^{def}
7 - Soolan	151 ^{bc}	12090 ^a	45 ^{abcd}	16.1 ^{bde}	64 ^a	1.7 ^e	0.82 ^{efg}	0.31 ^{def}	0.99 ^{abcde}	1.14 ^{cd}	2.1 ^{cde}	60 ^{abcd}
8 - Bardsir	118 ^f	11444 ^{abcd}	44 ^{abcd}	17.3 ^{abcd}	61 ^{bc}	1.7 ^{bc}	0.85 ^{abc}	0.35 ^{abc}	1.00 ^{abc}	1.20 ^{ab}	2.2 ^{ab}	61 ^{abc}
9 - Toyserkan	127 ^{def}	10430 ^{de}	47 ^{abc}	17.1 ^{abcd}	61 ^{cd}	1.9 ^a	0.82 ^{gh}	0.31 ^{def}	0.99 ^{abc}	1.13 ^{cd}	2.1 ^{cde}	60 ^{abcd}
10 - Amol	69 ^{gh}	7558 ^f	27 ^{fg}	11.4 ^{gh}	58 ^e	0.49 ^{fg}	0.81 ^{hi}	0.29 ^{figh}	0.99 ^{abc}	1.10 ^{ef}	2.1 ^{ef}	51 ⁱ
11 - Heidareh	158 ^{ab}	11885 ^{ab}	47 ^{abc}	17.1 ^{abcd}	64 ^a	1.4 ^e	0.82 ^{gh}	0.28 ^h	0.96 ^{de}	1.09 ^{ef}	2.1 ^{fg}	58 ^{bdef}
12 - Ramhormoz	21 ⁱ	2059 ^b	12.8 ^h	5.3 ^j	59 ^e	0.34 ^{gh}	0.82 ^{gh}	0.31 ^{efgh}	0.96 ^e	1.12 ^{de}	2.1 ^{ef}	55 ^{figh}
13 - Toeen	131 ^{cdef}	10701 ^{cde}	38 ^e	14.4 ^{ef}	62 ^{abc}	1.4 ^e	0.85 ^{abc}	0.34 ^{bcd}	1.00 ^{abc}	1.19 ^b	2.2 ^{ab}	58 ^{bdef}
14 - Isfahan	45 ^h	5696 ^g	15.1 ^h	7.7 ⁱ	49 ^f	0.28 ^h	0.78 ^j	0.24 ⁱ	0.98 ^{cde}	1.02 ^g	2.0 ^{gh}	50 ^j
15 - HosseinAbad	177 ^a	11348 ^{abcd}	46 ^{abcd}	17.2 ^{abcd}	62 ^{abc}	1.7 ^{abc}	0.84 ^{bcd}	0.34 ^{abc}	1.00 ^{abc}	1.19 ^b	2.2 ^b	57 ^{cdef}
16 - Tarom	69 ^g	7890 ^f	32 ^f	13 ^{fg}	59 ^{de}	0.56 ^f	0.85 ^{ab}	0.33 ^{cde}	0.99 ^{abcd}	1.18 ^b	2.2 ^{bc}	53 ^{ghi}
17 - AliAbad	148 ^{bcd}	11430 ^{abcd}	45 ^{abcd}	17.6 ^{abc}	61 ^{bcd}	1.6 ^{cd}	0.81 ^{hi}	0.30 ^{figh}	0.98 ^{cde}	1.10 ^{def}	2.1 ^{ef}	58 ^{bdef}
18 - Zabol	76 ^g	6985 ^f	25 ^g	9.5 ^{hi}	62 ^{abc}	0.42 ^{figh}	0.80 ⁱ	0.28 ^{gh}	0.91 ^f	1.08 ^f	1.99 ^h	56 ^{efg}

میانگین‌ها، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means, in each column, followed by at least one common letter are not significantly different at the 1% probability level- using LSD test.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات (ادامه)
Table 2- Mean comparison of traits (continued)

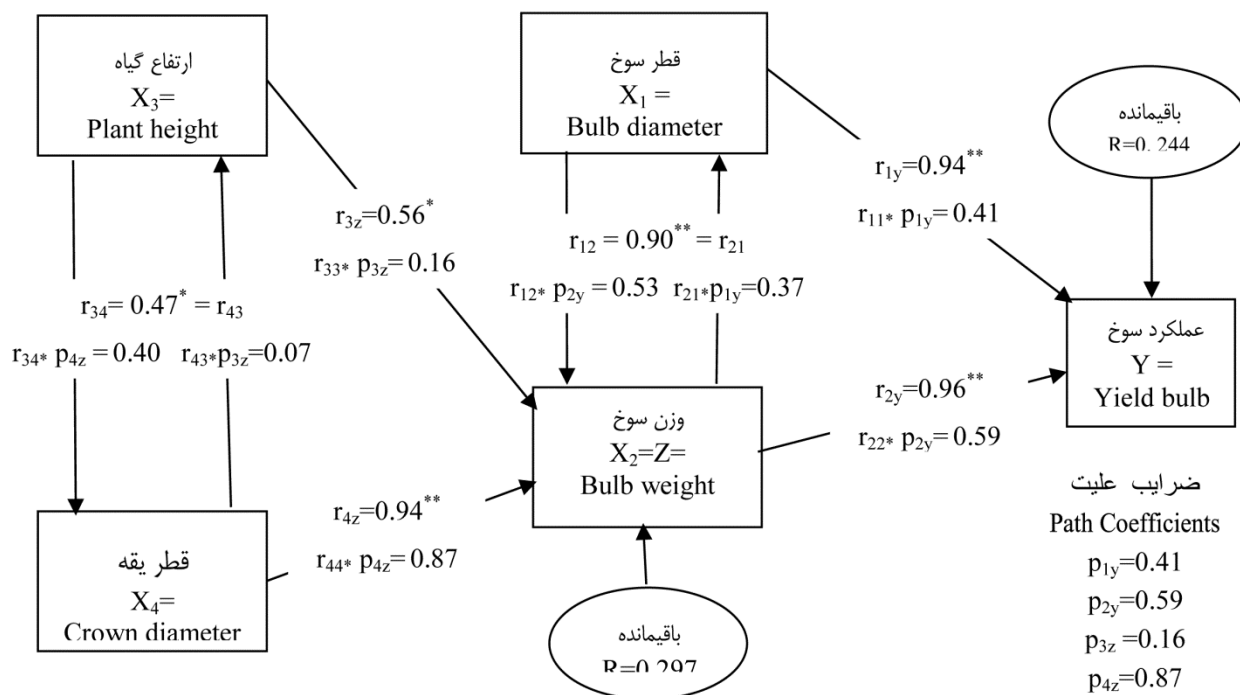
Trait	درصد افت وزنی حبه کدو (%)	وزن ۳۰ حبه تولید شده Weight of 30 cloves produced (g)	وزن خشک برگ بوته Leaf weight of plant dry (g)	وزن خشک ریشه بوته Dry weight of plant root (g)	شاخص برداشت سوخ HI	قطر سوخ Bulb diameter (mm)	طول سوخ Bulb length (mm)	عرض سوخ Bulb width (mm)	ضریب کرویته Coefficient sphericity	تعداد لایه Number of layer	تعداد حبه Number of clove	وزن حبه Weight of clove (g)	قطر یقه Crown diameter (mm)
1	10 ^{bc}	115 ^e	4.9 ^{cdef}	0.25 ^h	76 ^{defg}	32 ^{bcd}	56 ^{bc}	49 ^{ab}	0.80 ^{efg}	4.2 ^{ab}	8.5 ^b	4.8 ^f	16.1 ^{abc}
2	20 ^a	66 ^{gh}	2 ^h	0.15 ⁱ	83 ^{ab}	31 ^{de}	46 ^d	40 ^d	0.84 ^{cd}	2.8 ^h	8.1 ^{bcd}	2.9 ^g	8.7 ^d
3	7 ^{efgh}	134 ^d	4.7 ^{def}	0.29 ^{gh}	78 ^{cde}	34 ^{ab}	55 ^c	49 ^{ab}	0.82 ^{def}	3.6 ^{cde}	8 ^{bcd}	5.6 ^{cdef}	15.9 ^{abc}
4	7 ^{efgh}	136 ^{cd}	5.4 ^{ab}	0.41 ^{abc}	73 ^{gh}	34 ^{ab}	58 ^{abc}	45 ^c	0.77 ^{gh}	4.1 ^{ab}	6.8 ^{efghi}	5.7 ^{bcd}	14.9 ^c
5	8 ^{ef}	137 ^{cd}	5 ^{bcd}	0.42 ^a	74 ^{fgh}	34 ^{ab}	58 ^{abc}	50 ^{ab}	0.79 ^{fgh}	3.4 ^{efg}	7.4 ^{cdef}	5.1 ^{def}	16.9 ^a
6	11 ^b	174 ^a	5.2 ^{abc}	0.42 ^{ab}	74 ^{fgh}	33 ^b	61 ^a	49 ^{ab}	0.76 ^h	3.6 ^{cde}	6.3 ^{ghi}	6 ^{bcd}	17.2 ^a
7	10 ^{bcd}	151 ^{bc}	4.7 ^{def}	0.35 ^{def}	76 ^{defgh}	34 ^{ab}	59 ^{ab}	48 ^{ab}	0.78 ^{fgh}	4 ^{abc}	6.7 ^{efghi}	6 ^{bcd}	16.1 ^{abc}
8	11 ^b	163 ^{ab}	4.5 ^f	0.32 ^{defg}	80 ^{bcd}	33 ^b	58 ^{abc}	48 ^{abc}	0.78 ^{fgh}	4.2 ^a	6.6 ^{fghi}	6.6 ^{ab}	15.9 ^{abc}
9	7 ^{efgh}	142 ^{cd}	4.7 ^{def}	0.37 ^{bcd}	77 ^{cdef}	31 ^{cde}	57 ^{bc}	47 ^{bc}	0.77 ^{gh}	3.5 ^{def}	6.5 ^{fghi}	6.3 ^{abc}	15.1 ^{bc}
10	6 ^h	70 ^{gh}	3.1 ^g	0.13 ^{ij}	78 ^{cde}	30 ^e	45 ^d	41 ^d	0.85 ^{bcd}	3.1 ^{gh}	8.4 ^{bc}	3 ^g	9 ^d
11	9 ^{cde}	135 ^d	5.1 ^{abcd}	0.34 ^{def}	76 ^{efgh}	34 ^{ab}	57 ^{abc}	49 ^{ab}	0.79 ^{efgh}	4.1 ^{ab}	7.9 ^{bcd}	5.4 ^{cdef}	16.9 ^a
12	6 ^{gh}	24 ⁱ	1.2 ⁱ	0.06 ^k	80 ^{bc}	25 ^g	34 ^e	32 ^e	0.88 ^{ab}	2.3 ⁱ	13.1 ^a	0.92 ^h	5.8 ^e
13	8 ^{def}	137 ^{cd}	5.1 ^{abcde}	0.36 ^{cde}	72 ^h	33 ^{bc}	57 ^{bc}	49 ^{ab}	0.79 ^{fgh}	4.1 ^{ab}	7.1 ^{defgh}	4.9 ^{ef}	15.6 ^{abc}
14	6 ^h	56 ^h	1.2 ⁱ	0.10 ^{jk}	85 ^a	28 ^f	34 ^e	31 ^e	0.91 ^a	1.9 ^j	6.1 ^{hi}	2.3 ^g	6.1 ^e
15	8 ^{efg}	147 ^{cd}	4.6 ^{ef}	0.31 ^{efgh}	78 ^{cde}	35 ^a	58 ^{abc}	50 ^{ab}	0.80 ^{efg}	3.8 ^{bcd}	7.8 ^{bcd}	5.5 ^{cdef}	16.9 ^a
16	9 ^{cde}	97 ^f	2.1 ^h	0.13 ^{ij}	85 ^a	32 ^{bcd}	46 ^d	41 ^d	0.86 ^{bc}	3.3 ^{fg}	6.1 ^{hi}	4.7 ^f	8 ^d
17	6 ^h	166 ^{ab}	5.4 ^a	0.38 ^{abcd}	75 ^{efgh}	34 ^{ab}	58 ^{abc}	50 ^a	0.79 ^{fgh}	4.1 ^{ab}	5.9 ⁱ	7.3 ^a	16.8 ^{ab}
18	6 ^h	78 ^g	2.8 ^g	0.30 ^{fgh}	75 ^{efgh}	30 ^e	46 ^d	39 ^d	0.83 ^{cde}	3.2 ^{fg}	7.2 ^{defg}	3.3 ^g	9.3 ^d

میانگین‌ها، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.
Means, in each column, followed by at least one common letter are not significantly different at the 1% probability level- using LSD test.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات (ادامه)
Table 2- Mean comparison of traits (continued)

صفت	ارتفاع گیاه (cm)	تعداد سبزی برگ	تعداد برگ افتاده	تعداد کل برگ	تعداد روز تا سبز شدن	تعداد روز تا رسیدگی	تعداد روز از سبز شدن تا رسیدگی	محتوای نسبی برگ RWC (%)	اسید پیروویک کل Total Pyruvic Acid (μmol/g)	اسید پیروویک غیر آنزیمی Nonenzymatic Pyruvic Acid (μmol/g)	اسید پیروویک آنزیمی Enzymatic Pyruvic Acid (μmol/g)	عملکرد آلیسین (kg/ha)
1	64 ^{bc}	8.9 ^{ab}	1.3 ^{efgh}	10.2 ^{bcd}	116 ^{cd}	229 ^{ab}	113 ^{ab}	71 ^{abc}	57 ^a	1.1 ^{defgh}	56 ^a	51 ^{ab}
2	66 ^{bc}	6.3 ^c	2.1 ^{ab}	8.4 ^{fg}	114 ^e	219 ^d	105 ^{fg}	69 ^{abcd}	48 ^{gh}	1.4 ^{cd}	47 ^{gh}	28 ^g
3	68 ^b	8.2 ^b	1.2 ^{efgh}	9.4 ^{def}	116 ^{cde}	228 ^b	113 ^{abc}	64 ^{fg}	49 ^{gh}	1.1 ^{efgh}	48 ^{gh}	44 ^{cd}
4	66 ^{bc}	9.3 ^a	1.1 ^{gh}	10.3 ^{abcd}	117 ^{abc}	230 ^a	114 ^{ab}	65 ^f	58 ^a	1 ^{efgh}	57 ^a	51 ^{ab}
5	66 ^{bc}	8.5 ^{ab}	1.2 ^{fgh}	9.7 ^{cde}	116 ^{bc}	223 ^c	107 ^{de}	67 ^{def}	52 ^{cdef}	1 ^{efgh}	51 ^{cde}	49 ^{abc}
6	67 ^{bc}	8.6 ^{ab}	1.6 ^{cde}	10.2 ^{bcd}	116 ^{bc}	229 ^{ab}	113 ^{abc}	68 ^{cde}	43 ⁱ	0.96 ^h	42 ⁱ	35 ^{ef}
7	66 ^{bc}	9.2 ^{ab}	2.2 ^a	11.5 ^a	116 ^{cd}	224 ^c	108 ^d	65 ^f	46 ^{hi}	1.1 ^{efgh}	45 ^{hi}	44 ^{cd}
8	66 ^{bc}	9.6 ^a	1.8 ^{bcd}	11.3 ^{ab}	114 ^e	228 ^b	114 ^{ab}	71 ^{ab}	50 ^{defg}	0.96 ^{gh}	49 ^{defg}	45 ^{bcd}
9	66 ^{bc}	8.7 ^{ab}	1.4 ^{defg}	10.2 ^{cd}	118 ^a	228 ^b	111 ^c	69 ^{bcd}	49 ^{gh}	1 ^{gh}	48 ^{gh}	41 ^{de}
10	75 ^a	6.2 ^c	1.6 ^{cde}	7.7 ^g	116 ^{bc}	229 ^{ab}	112 ^{bc}	72 ^a	50 ^{efg}	1.2 ^{def}	48 ^{efg}	29 ^{fg}
11	67 ^{bc}	9 ^{ab}	0.92 ^h	9.9 ^{cd}	117 ^{ab}	228 ^b	111 ^c	66 ^{ef}	53 ^{cde}	0.98 ^{fgh}	52 ^{cd}	49 ^{abc}
12	55 ^d	6.2 ^c	1.8 ^{bc}	8 ^g	116 ^{abc}	219 ^d	103 ^h	62 ^{gh}	34 ^j	2 ^a	32 ^j	4.9 ⁱ
13	63 ^c	9.4 ^a	0.94 ^h	10.3 ^{abcd}	116 ^{cde}	229 ^{ab}	114 ^{ab}	65 ^f	53 ^{cd}	1.1 ^{efgh}	52 ^{cd}	45 ^{bcd}
14	59 ^d	6.4 ^c	2.3 ^a	8.7 ^{efg}	116 ^{cde}	219 ^d	103 ^{gh}	61 ^h	33 ^j	1.5 ^{bc}	31 ^j	13.7 ^h
15	68 ^b	9.1 ^{ab}	1.5 ^{def}	10.5 ^{abcd}	115 ^e	229 ^{ab}	114 ^a	65 ^f	49 ^{fgh}	1.2 ^{cdef}	48 ^{fgh}	44 ^{cd}
16	65 ^{bc}	6.5 ^c	2.3 ^a	8.7 ^{efg}	115 ^{de}	220 ^d	105 ^{efg}	65 ^{ef}	53 ^{cde}	1.7 ^b	51 ^{cdef}	33 ^{fg}
17	68 ^b	9.1 ^{ab}	1.6 ^{cdef}	10.6 ^{abc}	115 ^e	229 ^{ab}	115 ^a	67 ^{def}	57 ^{ab}	1.2 ^{defg}	55 ^{ab}	53 ^a
18	64 ^{bc}	6.6 ^c	2 ^{ab}	8.6 ^{efg}	116 ^{abc}	223 ^c	106 ^{def}	71 ^{ab}	54 ^{bc}	1.3 ^{cde}	53 ^{bc}	29 ^{fg}

میانگین‌ها، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.
Means, in each column, followed by at least one common letter are not significantly different at the 1% probability level- using LSD test.



شکل ۳- تجزیه علیت عملکرد سوخ و وزن سوخ در ۱۸ توده بومی سیر ایرانی
Figure 3- Path analysis of bulb yield and bulb weight in 18 landraces of Iranian garlic

تجزیه رگرسیون گام به گام بین وزن سوخ و سایر صفات به جز عملکرد سوخ، رابطه رگرسیونی بین وزن سوخ و صفات قطر یقه و ارتفاع بوته با ضریب تبیین ۹۱/۱۴ درصد و سطح معنی‌دار ضرایب چندجمله‌ای ۵ درصد نشان داد.

$$(۲) \quad (g) = -22/2 + 0/447 \text{ ارتفاع بوته} + 2/234 \text{ قطر یقه} + 0/297 \text{ وزن سوخ تازه}$$

نتایج تجزیه علیت دلالت بر این دارد که اثرات مستقیم و غیرمستقیم این دو صفت باعث افزایش وزن سوخ می‌شوند. ۶۸/۷ درصد اثرات این دو صفت به طور مستقیم و ۳۱/۳ درصد به طور غیرمستقیم بر روی وزن سوخ تأثیر دارند. بیش از ۹۲/۵ درصد اثرات قطر یقه به طور مستقیم و ۷۴/۵ درصد اثرات ارتفاع بوته به طور غیرمستقیم از طریق قطر یقه باعث افزایش وزن سوخ می‌شود. در مجموع ۶۲/۷ درصد اثرات مستقیم و غیرمستقیم از طریق قطر یقه باعث افزایش وزن سوخ می‌شود. اثرات باقیمانده در این تجزیه ۰/۲۹۷ می‌باشد.

در ضمن صفات مستقل با صفات تابع دخیل در تجزیه علیت ضرایب همبستگی معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد داشتند (مندرج در شکل ۳). ضرایب همبستگی ساده با ضرایب چند جمله‌ای هم‌علامت (هم‌راستا) و مثبت می‌باشند. کالو (۱۷) نشان داد صفات وزن سوخ سیر، تعداد سیرچه در سوخ، ارتفاع بوته و قطر سوخ بیشترین اثر مستقیم؛ و قطر سوخ، طول سیرچه از طریق وزن سوخ

با این وجود بقالیان و همکاران (۳) نشان داده‌اند که عوامل دخیل در مقدار آلیسین و تندی توده‌های بومی سیر ایرانی بیشتر ژنتیکی‌اند تا محیطی. در مجموع با در نظر گرفتن هر دو صفت مهم اقتصادی، توده محلی علی‌آباد با ۶۳۳ و توده محلی رامهرمز با ۶۵/۷ مول به ترتیب بیشترین و کمترین اسید پیروویک در هکتار را تولید کردند که به ترتیب معادل ۵۲/۷۵ و ۴/۹۱ کیلوگرم آلیسین در هکتار است.

تجزیه رگرسیون گام به گام بین عملکرد سوخ و سایر صفات، رابطه رگرسیونی بین عملکرد و صفات وزن سوخ تر و قطر سوخ را نشان داد. ضریب تبیین این رابطه ۹۴/۸۹ درصد و سطح معنی‌دار ضرایب چندجمله‌ای ۵ درصد است.

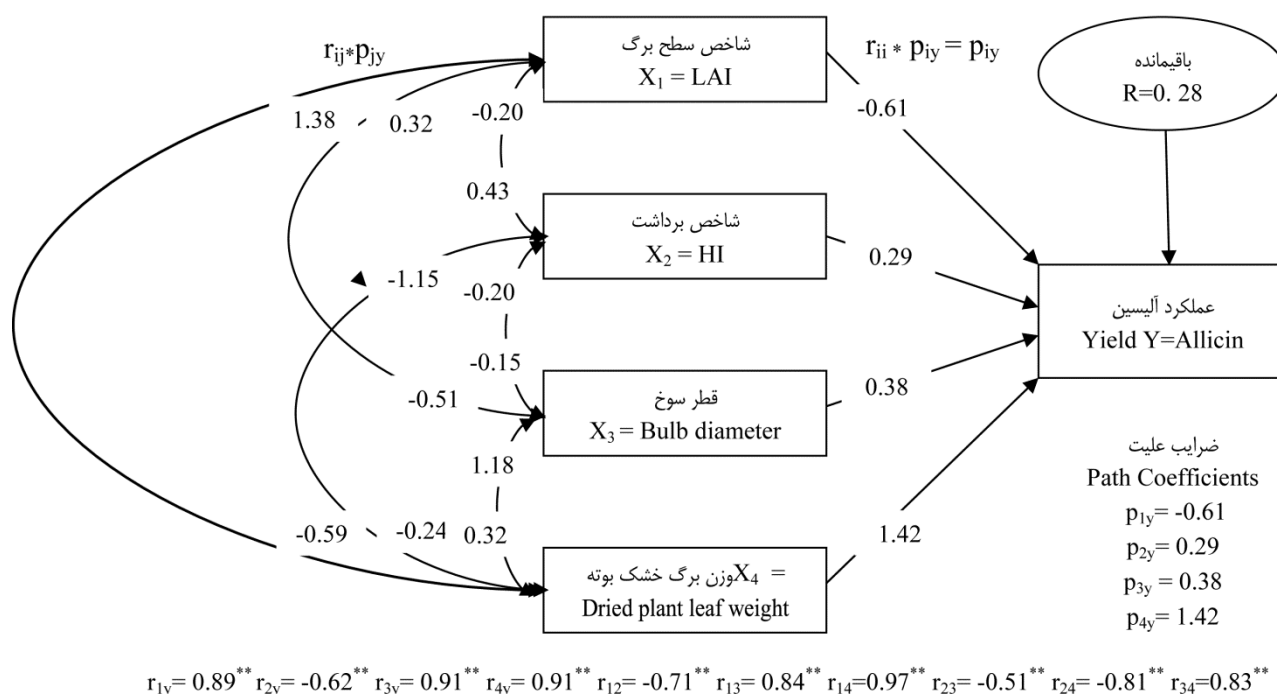
$$(۱) \quad (g) = -10780 + 130/9 \text{ وزن سوخ تازه} + 480 \text{ قطر سوخ} + 0/244 \text{ عملکرد سوخ}$$

نتایج تجزیه علیت نشان داد که اثرات مستقیم و غیرمستقیم این دو صفت باعث افزایش عملکرد سوخ می‌شوند (شکل ۳). ۵۲/۶ درصد اثرات این دو صفت به طور مستقیم بر روی عملکرد تأثیر دارند و حدود ۴۷/۴ درصد به طور غیرمستقیم اثر می‌کنند. ۶۱/۵ درصد اثرات وزن سوخ به طور مستقیم و ۵۶/۴ درصد اثرات قطر سوخ از طریق وزن سوخ به طور غیرمستقیم باعث افزایش عملکرد می‌شود. در مجموع ۵۰/۵ درصد اثرات مستقیم و غیرمستقیم از طریق وزن سوخ باعث افزایش عملکرد سوخ می‌شود. اثرات باقیمانده در این تجزیه ۰/۲۴۴ می‌باشد.

و اثر غیرمستقیم مثبت شاخص سطح برگ از طریق وزن برگ خشک بوته بر مقدار آلیسین و بیشترین اثر غیرمستقیم منفی را شاخص برداشت از طریق وزن برگ خشک بوته بر مقدار آلیسین دارد (شکل ۴). در واقع افزایش ماده خشک برگ بوته اگر با افزایش سطح برگ یا افزایش شاخص برداشت همراه باشد باعث رقابت با سنتز آلیسین می‌شود، ولی اگر با افزایش قطر سوخ همراه باشد باعث افزایش سنتز آلیسین می‌شود.

$$(۳) \quad \text{شاخص برداشت } 1/1 + \text{شاخص سطح برگ } 11 - 133 = (\text{kg/ha}) \text{ آلیسین} \\ (\text{g}) \text{ وزن برگ خشک بوته } 12 + (\text{mm}) \text{ قطر سوخ } 1/6 +$$

بیشترین اثرات غیر مستقیم را بر روی عملکرد سوخ دارند. تجزیه رگرسیون گام به گام بین عملکرد آلیسین و سایر صفات، رابطه رگرسیونی بین عملکرد آلیسین با صفات شاخص سطح برگ، شاخص برداشت، قطر سوخ و وزن برگ خشک بوته با ضریب تبیین ۸۸/۷۷ درصد و سطح معنی‌دار ۵ درصد ضرایب چند جمله‌ای دارد. شاخص سطح برگ و شاخص برداشت به ترتیب اثر مستقیم منفی و مثبت بر مقدار آلیسین دارند. ولی اثرات غیرمستقیم از طریق سایر صفات باعث شده ضریب همبستگی این دو شاخص به ترتیب مثبت و منفی بدست آید. بیشترین اثر مستقیم مثبت را وزن برگ خشک بوته



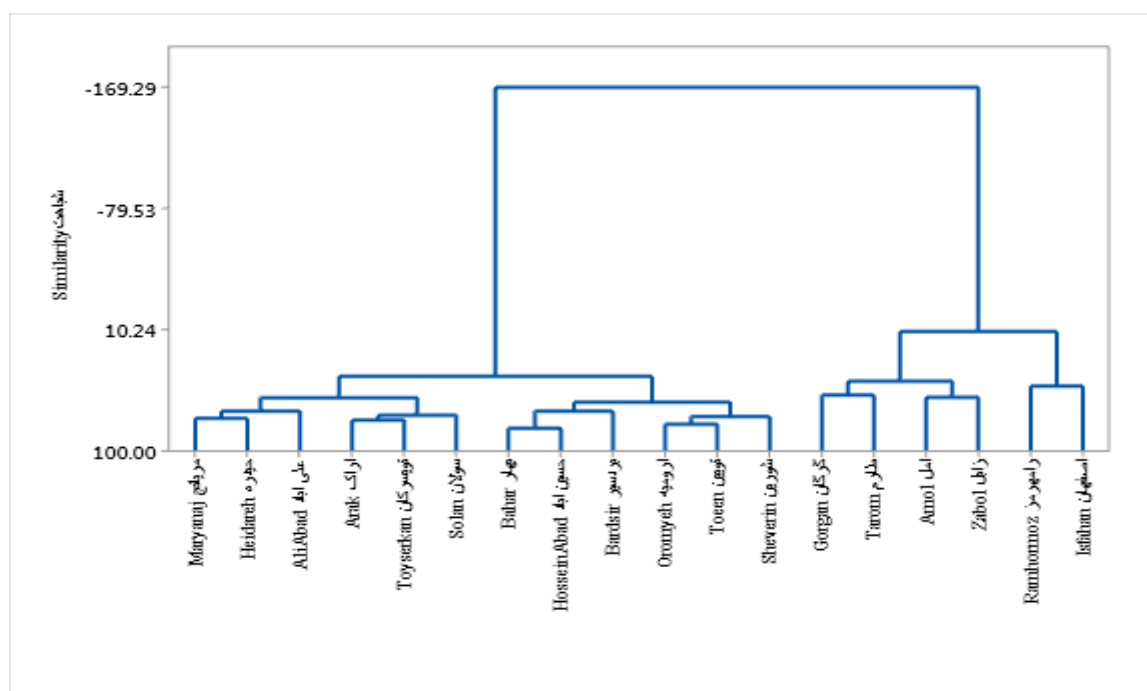
شکل ۴- تجزیه علیت عملکرد آلیسین در ۱۸ توده بومی سیر ایرانی
Figure 4- Path analysis of Allicin yield in 18 landraces of Iranian garlic

و ۶).

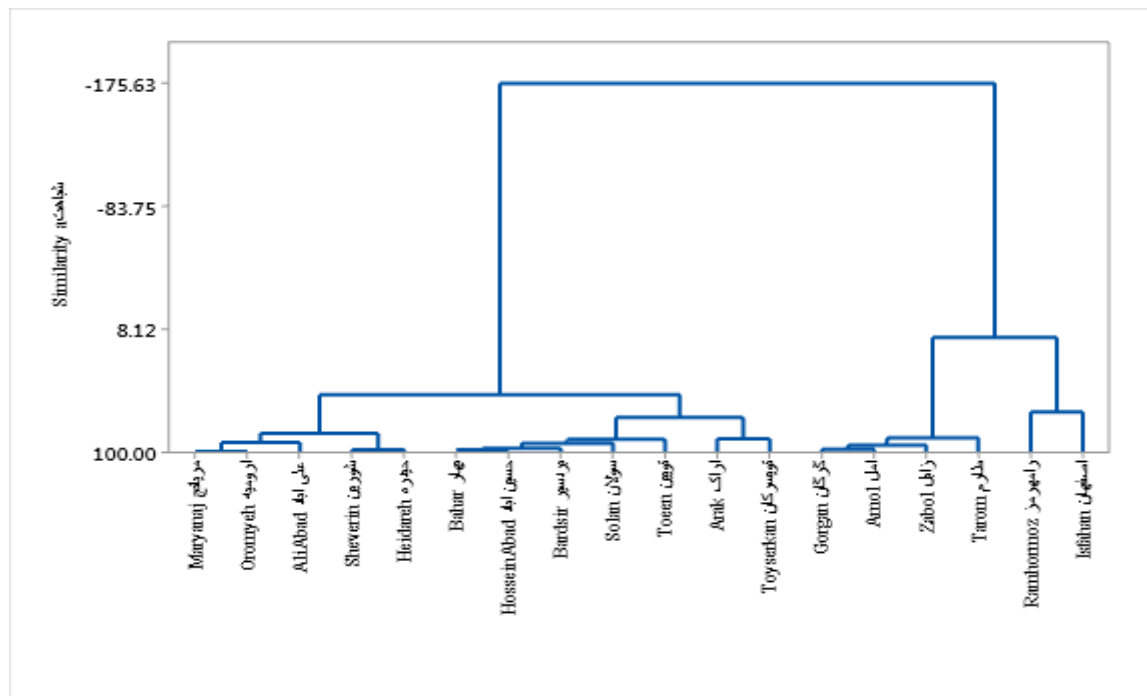
نتیجه‌گیری

در داخل کشور تا کنون توجه خاصی در مورد اصلاح و معرفی رقم سیر به جز یک مورد صورت نگرفته است. تنها رقم معرفی شده رقم مازند است که سال ۱۳۸۱ از طریق انتخاب فنوتیپی درون توده محلی سیر مازندران معرفی شده که مناسب کشت آن مناطق است.

تجزیه خوشه‌ای با نرم افزار مینی تب ۱۹ به روش Ward با فاصله اقلیدسی بر روی داده‌های استاندارد شده (شکل ۵)، توده‌های محلی مورد بررسی را به ۲ گروه اصلی (۶ و ۱۲ عضوی) تقسیم کرد، که با توجه به عملکرد سوخ و آلیسین گروه ۱۲ عضوی مناسب کشت در منطقه همدان می‌باشد. این گروه نیز به ۴ زیرگروه تقسیم شده است که نشان از تنوع بالایی صفات است. نکته جالب توجه قرار گرفتن توده‌های ۴ (ارومیه)، ۶ (اراک) و ۸ (بردسیر کرمان) در گروه مناسب کشت در منطقه همدان است. همچنین اولین سطح گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای بر اساس کلیه صفات انطباق خوبی با تجزیه خوشه‌ای بر اساس دو صفت مهم اقتصادی عملکرد سوخ و آلیسین دارد (اشکال ۵



شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای ۱۸ توده محلی سیر ایرانی بر اساس ۳۷ صفت آگرومورفولوژیکی استاندارد شده
Figure 5-Cluster analysis of 18 landrace of Iranian garlic based on 37 standardized agromorphological traits



شکل ۶- تجزیه خوشه‌ای ۱۸ توده محلی سیر ایرانی بر اساس صفات عملکرد سوخ و آلیسین استاندارد شده
Figure 6-Cluster analysis of 18 landrace of Iranian garlic based on standardized Allicin and bulb yield traits

های مورد بررسی و مناسب همدان بر اساس انتخاب و علامت‌گذاری بوته‌ها در مزرعه به کمک شاخص قطر یقه و پس از برداشت به

بر اساس نتایج این آزمایش توصیه می‌شود به منظور افزایش موفقیت در اصلاح و معرفی رقم سیر در منطقه همدان از بین توده-

کمک شاخص وزن سوخ اقدام به انتخاب و تکثیر شود. از نتایج تجزیه ژرم پلاسما سیر به منظور حفظ حداکثر تنوع با کمترین حجم مواد خوشه‌ای این تحقیق نیز می‌توان برای مدیریت در حفظ و نگهداری ژنتیکی اقدام نمود.

منابع

- 1- Abedi M., Bayat F., and Nosrati A.E. 2013. Evaluation of agronomical traits and pyruvic acid content in Hamedan garlic (*Allium Sativum* L.) ecotypes. European Journal of Experimental Biology 3(2): 541-544.
- 2- Arnon A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal 23: 112- 121.
- 3- Baghalian K., Ziai S.A., Naghavi M.R., Naghdi Badi H., and Khalighi A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. Scientia Horticulturae 103: 155-166.
- 4- Bayat F., Soori J., Saedi H., Shaabanian M., Gholami B., and Goodarzi F. 2014. Effect of bulb and clove weights on the pungency and some quality and quantity attributes of the two ecotypes of Hamedan white garlic (*Allium sativum* L.). Final Report of Research Project, 45818 No. Agricultural Engineering Research Institute of Iran–AERI.
- 5- Block E. 1985. The chemistry of onions and garlic. Scientific American 252: 94-99.
- 6- Burba J.L., Portela J.A., and Lanzavechia S. 2005. Argentine Garlic I: A Wide Offer of Clonal Cultivars. Acta Horticulturae (ISHS) 688: 291-296. http://www.actahort.org/books/688/688_41.htm.
- 7- Camargo A., Masuelli R.W., and Burba J.L. 2005. Characterization of Argentine garlic cultivars for their allicin content. IV International Symposium on Edible Alliaceae. ISHS Acta Horticulturae 688: 309-312.
- 8- Cunha C.P., Hoogerheide E.S.S., Zucchi M.L., Monteiro M., and Pinheiro B. 2012. New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* L. (Alliaceae). American Journal of Botany 99(1): e17-e19.
- 9- Datshvarov S. 1997. The richness of geneticplasm garlic (*Allium sativum* L.) in Bulgaria. Acta Horticulturae 433: 137-140.
- 10- Del Pozo A., Ines Gonzalez M., and Barraza C. 1997. Phenological development of 13 clones of garlic, (*Allium sativum* L.): influence of temperature, Photoperiod and cold storage. Acta Horticulture 433: 389-394.
- 11- Eagling D., and Sterling S. 2000. A cholesterol-lowering extract from garlic. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Publication number 0063. Project number DAV-124A.
- 12- Endo A., Imai Y., Nakamura M., Yanagisawa E., Taguchi T., and Torii K. 2013. Distinct intraspecific variations of garlic (*Allium sativum* L.) revealed by the exon-intron sequences of the alliinase gene. Journal of Natural Medicines 68(2):442-447.
- 13- European Pharmacopoeia. 2005. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. 5th edition, Strasbourg (France): Council of Europe.
- 14- FAOSTAT. 2015. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- 15- Gomez Riera J.L.B. 1997. Characterization, adaptation and selection of garlic germplasm (*Allium sativum* L.) through the management of dormancy, in Mendoza, Argentina. Acta Horticulture 433: 151-164.
- 16- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 2000. Descriptors for *Allium*. Rome, Italy. 43 p.
- 17- Kallo G. 1988. Vegetable breeding. CRC press, Inc.
- 18- Kallo G., and Bergh B.O. 1993. Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon press. Oxford and New York. 833 pp.
- 19- Kamenetsky R., London Shafir I., Khassanov F., Kik C., van Heusden A.W., and Vrielinkvan Ginkel M. 2005. Diversity in fertility potential andorgano-sulphur compounds among garlics from Central Asia. Biodiversity Conservation 14: 281-295.
- 20- Ketter C.A.T., and Randle W.M. 1998. Pungency assessment in onions. S.J. Karcher, (ed). Proceeding of the 19 Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE) pp: 177-196.
- 21- Koch H.P., and Lawson L.D. 1996. Garlic. The science and therapeutic application of *Allium sativum* and related species 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 329 pp.
- 22- Lallan S., and Chauhan K.P.S. 1992. Effect of the method of planting and size of cloves on yield and quality of garlic. Newsletter of Associated Agriculture Development Foundation 12(2): 7-8.
- 23- Lampasona S.G., Asprelli P., Burba J.L. 2012. Genetic analysis of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm collection from Argentina. Scientia horticulturae 138: 183-189.
- 24- Lawson L.D., Wood S.G., and Hughes B.G. 1991. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. Planta Medica 57: 263-270.
- 25- Lopez Frasca A., Rigoni C., Silverstri V., and Burba J.L. 1997. Genetic Variability estimation and Correlation in White Clonal type Gralic (*Allium Sativum* L.) characters. Acta Horticulturae 433: 249-284.
- 26- Madamba P.S., Driscoll R.H., and Buckle K.A. 1993. Bulk Density, Porosity and Resistance to Airflow of Garlic Slices. Drying Technology 11(7): 1837-1854.
- 27- Mirzaei R., Liaghati H., and Mahdavi Damghani A. 2007. Evaluating Yield Quality and Quantity of Garlic as

- Affected by Different Farming Systems and Garlic Clones. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 2219-2224.
- 28- Natale P.J., Camargo A., and Galmarini C.R. 2005. Characterization of Argentine garlic cultivars by their pungency. IV International Symposium on Edible Alliaceae. ISHS Acta Horticulturae 688: 313-316.
 - 29- Ovesna J., Kucera L., Hornickova J., Svobodova L., Stavelikova H., and Velisek J. 2011. Diversity of S-alkyl cysteine sulphoxide content within a collection of garlic (*Allium sativum* L.) and its association with the morphological and genetic background assessed by AFLP. Horticultural science 129: 541-547.
 - 30- Ritchie S.W., Nguyen H.T., and Holaday A.S. 1990. Leaf Water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science 30: 105-111.
 - 31- Stavelikova H. 2008. Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection – Information. Horticulture Science 35(3): 130-135.
 - 32- Stoll A., and Seebeek E. 1947. Alliin, the pure mother substance of garlic oil. Experientia 3(114): 1-8.
 - 33- Vafae Y., Dashti F., Mardi M., and Ershadi A. 2009. Assessment of Genetic Diversity Among Iranian Garlic Landraces (*Allium sativum* L.) Using Morphological Traits and Molecular Markers. Iranian Journal of Horticultural Sciences 40(1): 13-22.
 - 34- Vafae Y., Dashti F., Mozaffari A., and Baghalian K. 2007. Diversity evaluation of Iranian and several exotic garlic (*Allium sativum* L.) clones using morphological traits. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 8(4): 259-280.
 - 35- Wall M.W., and Corgan J.N. 1992. Relationship between pyruvate analysis and flavor perception for onion pungency determination. Horticulture Science 27: 1029-1030.
 - 36- Xinhua W., and Wufeng D. 1997. Famous garlics native to China: Its problems and strategies. Acta Horticulturae 433: 133-136.



Study of Agromorphological Diversity, and Path Analysis of Bulb Yield and Allicin Content of Iranian Garlic Landraces under Hamedan Region

M.H. Alemkhoumaram¹- A.H. Keshtkar^{2*}- A. Mirzaie Asl³

Received: 26-12-2018

Accepted: 30-07-2019

Introduction: Garlic is native to central Asia, with a three thousand years history of human consumption and use. Global consumption has increased fourfold during the 24-years period from 1989 to 2013. Area under garlic cultivation, average yield/ha and total production of the world were 1,468,811 ha, 18,092 kg/ha and 26,573,001 tons, respectively in 2016; and China produces about 80% of world garlic production. The maximum global record has been registered at 2012 with an average bulb yield of 45,270 tons per hectare belongs to Uzbekistan. The area under cultivation of this plant in Iran is about 9000 hectares with an average yield of 10 tons per hectare. Garlic has been used both as a food flavoring and as a traditional medicine, and these characteristics are affected by sulfur compounds. Alliin ($C_6H_{11}NO_3S$) with 177.22 molecule weight is a sulfoxide that is a natural constituent of fresh garlic. It is a derivative of the amino acid cysteine. When fresh garlic is chopped or crushed, the alliinase enzyme, which contains pyridoxal phosphate (PLP), cleaves alliin, generating allylsulfenic acid, pyruvate ($C_3H_4O_3$), and ammonium (NH_3). At room temperature two moles of allylsulfenic acid as an unstable and highly reactive compound that through a dehydration reaction form one mole of allicin ($C_6H_{10}OS_2$) with 162.26 molecule weight, which is responsible for the aroma of fresh garlic. In general, alliinase needs few minutes time to effect on every two molecules of alliin to form one molecule of allicin, two molecules of pyruvate and two molecules of ammonium. The generated allicin is unstable and quickly breaks down, for example during sixteen hours at 23°C it converts to a series of other sulfur-containing compounds such as diallyl disulfide. Allicin is part of a common defense mechanism in garlic plants against pest attacks. It is produced and activated after causing physical injuries. Iranian garlic has a good flavor, while with the exception of Mazand cultivar so far there is no other introduced bred cultivar. In this effort, diversity of agromorphological traits, bulb yield and allicin content of some Iranian landraces were studied to breed promising cultivar/s by single-bulb selection method for Hamedan climatic condition.

Materials and Methods: The experiment was carried out on the basis of a randomized complete block design (RCBD) with four replications in 2015-16 agronomy season at the Agricultural Research, Education and Natural Resources Center of Hamedan Province Located about 6 km north of Hamedan at the altitude of 1740 meters above sea level, longitude 48°, 52 E, latitude 34°, 52 N. The soil texture of the test site was loam with 24.4, 40.6 and 35 percent of clay, silt and sand, respectively. The soil tillage operation included plowing with the moldboard plow, disc and leveler. The furrow and stack were created with a width of 50 cm. Nine landraces from Hamedan province (Maryanaj, Bahar, Sheverin, Soolan, Toyserkan, Heidareh, Toeen, Hossein Abad and Ali Abad, and other nine ones from Gorgan (Golestan), Oromyeh (West Azarbaijan), Arak (Markazi), Bardsir (Kerman), Amol (Mazandaran), Ramhormoz (Khuzestan), Isfahan (Isfahan), Tarom (Zanjan) and Zabol (Sistan) cultivated on plots having 2 ridges with 4 meters long. Two rows were planted on the ridge with 25 and 10 cm spacing between rows and plants on the row, respectively (40 plant m⁻²). Bulb planting was carried out on November 17th, and first irrigation was rain-fed on 18th and 19th of November, with 19 and 9.9 mm rain, respectively, and during the fall and winter seasons, all water requirements were met through precipitation. Different landraces germinated from March 12th to March 16th. Pressure irrigation system was installed by re-growing in spring and plants were irrigated every seven to 10 days, depend on air temperature severity, until June 5th. Harvesting of different landraces was carried out by hands from June 26th to July 6th. Evaluated traits for each plot included weight of 30 seed clove, date of germination and maturity, number of plant per plot, chlorophyll a and b and carotenoids content of leaf, chlorophyll index by SPAD, relative water content of leaf, bulb yield, and weight of 30 produced clove, total pyruvic acid, and non-enzymatic pyruvic acid. The evaluated traits for five normal random plants (healthy plants on both sides, and on the opposite side of cultivation lines adjacent to the healthy plant) of each plot were including height, crown diameter, number of leaf, number of fallen leaf, length and width and

1 and 2- Ph.D. Student and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

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

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

leaf area, dry weight of plant leaf, dry weight of plant root (to a radius of five centimeters around the bulb) height and width and length of bulb, dry matter of bulb, number of skin layers, number and weight of clove, dry matter percentage. Assessment were also considered based on traits such as, moisture percentage of bulb, leaf area index, sum of chlorophyll a and b, loss weight of cuddle, harvest index, sphericity coefficient of bulb, total number of plant leaf, days number of germination to maturity, enzymatic pyruvic acid and allicin. Traits measurements were done based on "Descriptors for *Allium*". To measure pyruvic acid, 25 g of cloves with 25 ml of water were completely homogeneous in a mixer and passed through a filter paper after ten minutes. Ten ml of filtrated extract was increased into 100 ml volume with water and a half-milliliter of it was taken and added to 1.5 ml of 5% trichloroacetic acid solution, and after one hour, 18 ml of water was added to sample. Then one ml of resulting solution and each standard solution were transferred to separate test tubes. One ml of water and dinitrophenyl hydrazine 0.0125%, were added to each sample, and were heated in bain-marie bath at 37°C for ten minutes. At the end, by adding five ml of 0.6% normal caustic soda to the test tubes, the concentration of samples were determined in the presence of standard solutions (0.01, 0.225, 0.05, 0.1 and 0.2 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ sodium pyruvate) at 420 nm wavelength using spectrophotometer Pharmacia-Biotech model Novaspec II. To assess non-enzymatic pyruvate activity, alinase enzyme must become inactivated, so 40 to 60 grams of garlic clove is initially heated in microwave at 900 watts for three seconds for every gram of sample (120 to 180 seconds).

To find relationship between variables, the correlation coefficients between them were calculated. The study of the relationship between traits with bulb yield and allicin yield was done by stepwise regression method. Causal relationships and direct and indirect effects of traits on bulb and allicin were determined by path analysis method. Analysis of variance, mean comparison of traits by LSD method at 1% probability level, correlation determination, stepwise regression analysis and cluster analysis were done by Minitab software version 17.3.1, while Microsoft Word and Excel 2003 softwares were used to draw the graphs and path analysis, respectively.

Results and Discussion: The results shown that Iranian garlic landraces have noticeable diversity of agromorphological traits, such as weight of 30 seed clove from 21 (Ramhormoz landrace) to 177 g (Hossein Abad landrace), bulb yield from 2059 (Ramhormaoz landrace) to 12090 kg ha^{-1} (Soolan landrace), Allicin yield from 4.9 (Ramhormoz landrace) to 53 kg ha^{-1} (Ali Abad landrace), bulb weight from 12.8 (Ramhormoz landrace) to 48 g (Bardsir landrace) and bulb diameter from 28 (Isfahan landrace) to 35 mm (Hossein Abad landrace), which are necessary for breeding programs. It is also confirmed that the adapted landraces from one region may have acceptable production in other regions. According to the present results, landraces from Oromyeh (10866 kg/ha), Arak (9941 kg/ha) and Bardsir (11444 kg/ha) produced high yield in Hamedan climatic condition, so that the maximum allicin content were produced by landraces from Ali Abad (53 kg/ha), Maryanaj (51 kg/ha) and Oromyeh (51 kg/ha). Allicin content is calculated based on the bulb yield, and enzymatic pyruvic acid content and its molar relationship with allicin. In the recommended equilibrium of chemical reaction, the alliin coefficient on the one side is two and the coefficients of allicin and pyruvic acid on the other side are two and one, respectively. Bulb weight directly and crown diameter indirectly had highly correlation with bulb yield; and leaf area index, harvest index, bulb diameter and dry weight of plant leaf showed a high correlation with allicin content. The cluster analysis used standardized traits to divide landraces into two main groups as suitable and unsuitable sets to plant under Hamadan climatic conditions.

Conclusion: According to the results of the present study, it is recommended that Oromyeh, Soolan and Heidareh landraces can be used as valuable populations for breeding and introducing the suitable cultivars for Hamedan climatic condition through single-bulb selection method. Characteristics with easy and low cost assessment, such as crown diameter, leaf area index, bulb diameter under field condition; and after harvest measurements, such as bulb weight, harvest index, dry weight of plant leaf traits can also be considered as suitable selection indicators in breeding programs. Thirdly, the current study indicated that the cost of preserving garlic germplasm resources can be decreased by reducing the amount of stored materials, without the significant decline in genetic diversity.

Keywords: Cluster analysis, Garlic, Genetic diversity, Pyruvic acid, Stepwise regression



بررسی کارایی تیمارهای تلفیقی گرمادرمانی و کشت مریستم انتهایی بر تولید نهال عاری از سه ویروس آلوده کننده سیب "گوشت سرخ" (*Malus pumila* Mill.) در شرایط درون شیشه‌ای

نوشین کاظمی^{۱*} - علی اکبر حبشی^۲ - وهب اسدی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹

چکیده

این پژوهش با هدف تولید نهال عاری از سه ویروس ASGV، ASPV، ACLSV سیب "گوشت سرخ" (*Malus pumila* Mill.)، در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) در سال ۱۳۹۴ انجام شد. آزمایش‌ها با ارزیابی اثربخشی تیمار گرمادرمانی (۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و کشت مریستم انتهایی (در سه اندازه کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر) بر نرخ حذف ویروس از ریزشاخه‌ها انجام شد. در ابتدا حضور ویروس‌های ASGV، ASPV و ACLSV در نمونه‌های مادری با روش‌های آزمون الایزای ساندویچ دو طرفه آنتی بادی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تیمارهای گرمادرمانی و کشت مریستم در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. ریزشاخه‌های رشد یافته از مریستم توسط الایزا و RT-PCR برای هر سه ویروس بررسی شدند. به‌طور کلی نرخ حذف سه ویروس ACLSV (۲۵/۹ درصد)، ASGV (۷/۴ درصد) و ASPV (۴۴/۴ درصد) با یکدیگر متفاوت بود. نتایج نشان داد افزایش طول مدت گرمادرمانی و کاهش اندازه مریستم با اثر گذاری متفاوت بر ویروس‌های مورد مطالعه باعث افزایش نرخ عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس شده است. افزایش دوره زمانی گرمادرمانی در ۲۱ روز باعث کاهش رشد و تکثیر و حتی از بین رفتن ریزنمونه‌ها شد. بنابراین ۱۴ روز گرمادرمانی مؤثرترین تیمار جهت حذف آلودگی ویروس‌های ASGV (۱۱/۱۱ درصد)، ASPV (۸۸/۸۹ درصد) و ACLSV (۴۴/۴۴ درصد) از ریزنمونه‌های مورد مطالعه بود. در پایان آزمایش نمونه‌هایی که توسط هر دو روش الایزا و RT-PCR سالم تشخیص داده شدند، تکثیر و ریشه‌دار شدند و در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: الایزا، Apple chlorotic leaf spot virus، Apple stem grooving virus، Apple stem pitting virus، RT-PCR

مقدمه

ترتیب از جنس‌های *Trichovirus*، *Capillivirus* و *Foveavirus* که هر سه در خانواده‌ی *Flexiviridae* قرار دارند، پاتوژن‌های رایجی در سیب و گلابی هستند که به‌طور معنی‌داری میزان محصول و کیفیت میوه را کاهش می‌دهند (۱ و ۹). برخلاف بسیاری از آفات و بیماری‌هایی که باعث کاهش عملکرد محصولات می‌شوند، هیچ روش مبارزه قطعی علیه آلودگی‌های ویروسی وجود ندارد. بنابراین استفاده از نهال‌های سالم و عاری از ویروس برای استفاده در باغ‌های مادری و در نهایت احداث باغ‌های سالم اجتناب ناپذیر است (۱۲ و ۱۵). از طرفی با توجه به اینکه هیچ ناقل طبیعی برای این ویروس‌ها شناخته نشده است، استفاده از ماده گیاهی سالم یک راه مؤثر برای جلوگیری از خسارت ویروس است (۲۳).

در آزمایش‌های گذشته روش‌های متعددی جهت حذف ویروس‌های دانه‌داران از جمله گرمادرمانی، شیمی درمانی و کشت مریستم انتهایی مورد بررسی قرار گرفته است، هر یک از محققین پیشین بر اساس هدف، امکانات و ارقام مورد بررسی از یک یا تلفیقی از روش -

سیب یکی از مهم‌ترین میوه‌های مناطق معتدله و سردسیری است که بالاترین نرخ تجارت جهانی میوه تازه و فرآورده را در بین محصولات باغی دارد. متأسفانه استفاده از نهال آلوده به ویروس، میزان تولید این محصول و حتی سلامت گیاه را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری‌که منجر به خسارت قابل ملاحظه و در نهایت افت عملکرد در کل جهان می‌شود (۷). ویروس‌های (Apple stem ASGV، chlorotic leaf spot virus) ACLSV و (Apple stem pitting virus) ASPV و grooving virus به

۱- پژوهشگر پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات و علوم باغبانی

(*) نویسنده مسئول: Email: nooshinkazemi792000@yahoo.com

۲- دانشیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران

۳- دانشجوی دکتری پژوهشکده ملی انگور و کشمش دانشگاه ملایر

۶/۸ گرم بر لیتر آگار (۱۰)، در اتاقک رشدی با دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند.

بررسی اولیه آلودگی ویروسی در ریزشاخه‌های مادری

پس از تکثیر اولیه، ریز نمونه‌های سیب گوشت سرخ با روش‌های الایزا و RT-PCR جهت بررسی حضور ویروس‌های ASGV، ACLSV و ASPV مطالعه شدند. جهت آزمون الایزای ساندویچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA) از کیت BIORBEA (سوئیس) استفاده شد. استخراج RNA از ریز نمونه‌ها برای RT-PCR با استفاده از پروتکل و بافر تهیه‌شده توسط معصومی و همکاران (۱۴) صورت گرفت و ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت دومرحله‌ای شرکت Thermo Scientific انجام شد و کیفیت آن با استفاده از آغازگر اکتین طراحی شده در پژوهش قبلی (۱۱) (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ویروس‌های ASPV، ACLSV و ASGV نیز در جدول (۱) ذکر شده است. آغازگر ویروس ASPV با بررسی مقالات و منابع موجود در این زمینه انتخاب شد، و آغازگر ویروس‌های ASGV و ACLSV با استفاده از اطلاعات ژنوم هر ویروس از پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) و (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) و با استفاده از یک ابزار طراحی اولیه آنلاین (www.genscript.com) و بر اساس ژن تولید پروتئین پوششی ویروس طراحی شدند (۱۱). دمای اتصال اختصاصی هر یک از آغازگرها با استفاده از گرادینت دمایی مورد بررسی قرار گرفت و دمای بهینه اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز (رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) قرار گرفت و سپس با کمک نور ماورای بنفش مشاهده شد.

اعمال تیمارهای حذف ویروس

پس از بررسی اولیه آلودگی در گیاه مادری، تعدادی از ریزنمونه‌های سیب "گوشت سرخ" به محیط کشت بهینه پرآوری منتقل شدند. ده روز پس از کشت، گیاهچه‌های درحال رشد در چهار رژیم زمانی گرمادرمانی قرار گرفتند. به این منظور گیاهچه‌ها ده روز پس از تکثیر در محیط کشت جدید (به‌صورت مستقیم و بدون افزایش تدریجی دما) برای مدت ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز در دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. گرمادرمانی ریزشاخه‌ها در محیط کشت پایه MS با افزودن چهار میکرومولار BAP، سه میکرومولار GA₃ در محیطی با شرایط نوری مناسب (۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور) انجام گرفت، تا نمونه‌ها امکان تولید و رشد شاخه‌های جدید را داشته باشند.

های مذکور بهره گرفته‌اند (۸، ۱۸، ۱۹ و ۲۳). به نظر می‌رسد زمانی که یک گیاه آلوده به ویروس در دمای بالا رشد می‌کند، تکثیر ویروس در این حالت کنترل می‌شود و تقسیم سلولی و رشد سریع‌تر گیاه نسبت به ویروس می‌تواند نقاط عاری از ویروس مخصوصاً در قسمت‌های رأسی گیاه، مانند نواحی مرستمی به وجود آورد. در نتیجه این احتمال وجود دارد که تکثیر ویروس در بافت‌ها محدود شود و از طرفی عدم وجود ارتباط آوندی کامل بین مرستم و بافت‌های زیرین باعث ایجاد نقاط عاری از ویروس در نواحی مرستمی شود (۶ و ۲۱). بنابراین گرمادرمانی یکی از مهم‌ترین راهکار حذف ویروس‌های درختان میوه مانند سیب و گلابی است و مرستم برداری پس از گرمادرمانی، جهت تکمیل فرآیند حذف ویروس بسیار رایج است (۱۸ و ۲۵). تکنیک الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay) با وسعت و کاربرد زیادی به عنوان یک راه تشخیص سریع آلودگی ویروسی در گیاهان مختلف استفاده می‌شود (۲ و ۱۳). به‌علاوه سنجش به کمک RT-PCR نیز به‌طور گسترده‌ای برای تشخیص ویروس‌های سیب و دیگر درختان میوه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶).

هدف از انجام این پژوهش دستیابی به دستورالعمل مناسب جهت عاری نمودن گیاه سیب "گوشت سرخ" از ویروس‌های زیانبار اقتصادی و تولید کلون‌های عاری از ویروس به شیوه ریز ازدیادی می‌باشد تا با حفظ این ژنوتیپ‌های ارزشمند به عنوان ژرم پلاسما بومی کشور در برنامه‌های اصلاحی آینده مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران (ABRII) انجام شد. نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق، یکی از ژنوتیپ‌های سیب "گوشت سرخ" (شکل ۳، A) بود که گیاهی منحصر به فرد از خانواده‌ی Rosaceae، جنس *Malus* و گونه *pumila* است. آنچه این گیاه را از دیگر گیاهان این گونه متمایز نموده، وجود میزان بالای آنتی‌اکسیدان و آنتوسیانین در کورتکس آن می‌باشد که علاوه بر ایجاد جذابیت ظاهری، خواص درمانی ویژه‌ای شامل جلوگیری از بیماری‌های قلبی، سرطان و دیابت دارد (۵).

نمونه‌های گیاهی در فصل بهار (اواخر اردیبهشت) از سرشاخه‌های در حال رشد سیب "گوشت سرخ" موجود در شهرستان شاهرود تهیه شدند. قطعات گیاهی شامل جوانه‌های جانبی با طول ۱/۵ تا ۲/۵ سانتی‌متر پس از ضدعفونی شدن در محیط کشت پایه MS به همراه دو میکرومولار BAP مستقر شدند. پس از شش هفته، ریزشاخه‌ها به محیط کشت بهینه پرآوری: محیط پایه MS حاوی چهار میکرومولار BAP، سه میکرومولار GA₃، ۳۰ بر لیتر گرم ساکاروز،

جدول ۱- فهرست توالی آغازگر اکتین و توالی آغازگرهای اختصاصی تشخیص وجود ASPV، ACLSV و ASGV در سیب

Table 1- The primer of actin and list of used primers in the multiplex detection for ASPV, ACLSV and ASGV in apple

نام ویروس Virus name	نام آغازگر primer	توالی (۵'-۳') Sequence (5' - 3')	اندازه Size(bp)	منبع Reference
ASGV	ASG-F ASG-R	GGAAGACGTGCTTCAACAAGC ATCCAACAGCGGAAACTGGG	236	11
ACLSV	ACLSV-F ACLSV-R	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	219	11
ASPV	ASPV247-F ASPV247-R	CAGTATTGTGCCTTYTAYGCRAAGC CCATAGAACGGATGCGGTACATYTG	247	4
ACTIN	ACTIN -F ACTIN -R	GTTCCCTGGTATTGCAGACCG CAAGGATGGACCCTCCAATCC	125	11

زایی منتقل شدند. این محیط کشت حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS ۱/۲، همراه ۳۰g/l ساکاروز و بدون هورمون بود. پس از انتقال ریزشاخه‌ها به محیط دوم ریشه‌زایی، شیشه‌های حاوی ریز نمونه در فیتوترون با متوسط دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور قرار گرفتند تا ریشه‌ها مشاهده شوند. گیاهان ریشه‌دار به داخل گلدان‌هایی به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر حاوی پرلایت و پیت ماس (۱:۱) استریل شده منتقل شدند و به مدت ۴ روز در رطوبت نسبی حدود ۹۰ درصد در گلخانه با دمای بین 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس سطح رطوبت نسبی به حدود ۶۰ درصد کاهش داده شد و گیاهان برای حدود چهار هفته در این شرایط قرار گرفتند. یک سال بعد حضور سه ویروس ASGV، ACLSV و ASPV با روش RT-PCR در نمونه‌ها مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت.

واکاوی آماری و بررسی عملکرد آزمایش‌ها

آزمایش‌ها به صورت آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای پژوهش شامل زمان قرارگیری ریزشاخه تحت تیمار گرمادرمانی در چهار سطح (۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) و اندازه مریستم در سه سطح (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر) بود. هر تیمار شامل پنج تکرار (در هر ظرف آزمایش پنج ریزنمونه قرار گرفت) بود به عبارتی ۳۰۰ واحد آزمایشی در این تیمارها قرار گرفتند. همچنین ۲۴۰ مریستم (چهار سطح تیمار زمانی گرمادرمانی، سه اندازه مریستم و ۲۰ تکرار) در این آزمایش کشت شد و ۷۲ ریزنمونه (چهار سطح تیمار زمانی گرمادرمانی، سه اندازه مریستم و شش تکرار) در پایان مراحل پژوهش با تکنیک‌های الایزا و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. محاسبات آماری داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد و نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel رسم گردید. میانگین تیمارها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

پس از پایان تیمارهای گرمادرمانی، اقدام به جداسازی مریستم انتهایی از ریزشاخه‌های رشد یافته در تیمارها گردید. مراحل جدا سازی مریستم زیر لوپ و تحت شرایط استریل در هود لامینار انجام گرفت. مریستم برداری در سه اندازه انجام شد (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر). محیط کشت مورد استفاده جهت رشد مریستم‌ها حاوی نمک‌های پایه و ویتامین‌های MS ۱/۲ بود به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP و ۲/۵ گرم بر لیتر ژلرایت جهت جامد کردن محیط کشت. ظروف مورد استفاده در این مرحله پتری‌های یک بار مصرف و استریل با قطر هشت سانتی‌متر بودند. پس از قرار دادن مریستم‌ها در محیط کشت، درب پتری‌ها با کمک پارافیلیم بسته شد و در نهایت برای رشد در فیتوترون با متوسط دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور مستقر شدند (۲۴). بعد از ۳۰ تا ۳۵ روز مریستم‌های رشد کرده و زنده مانده (شکل ۳، B1)، به محیط کشت تکثیر، در شیشه‌های مک‌کارتی (به ارتفاع هشت سانتی‌متر و قطر داخلی ۲۰ میلی‌متر) منتقل شدند. پس از یک ماه ریزشاخه‌ها به محیط کشت تکثیر سیب در شیشه‌های بزرگ‌تر (جار آزمایشگاهی) منتقل شدند.

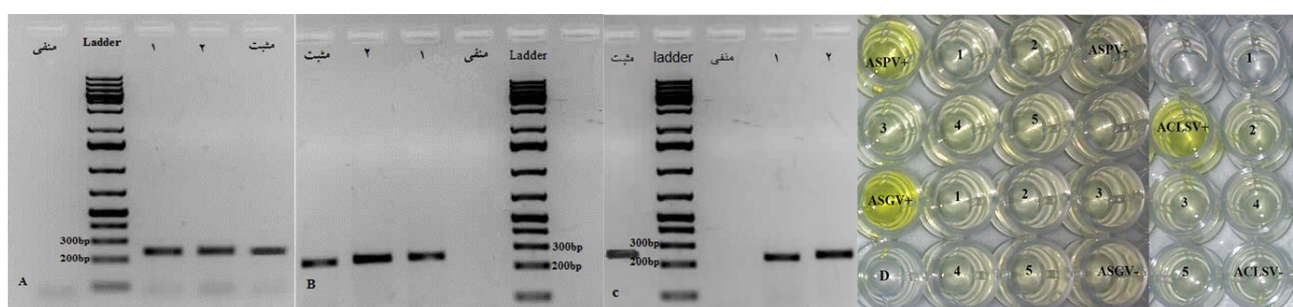
تکثیر گیاهچه‌های عاری از سه ویروس ASGV، ACLSV و ASPV

هشت ماه پس از اعمال تیمار گرمادرمانی گیاهان رشد یافته از مریستم، از نظر وجود ویروس بررسی شدند. گیاهانی که با هر دو روش الایزا و RT-PCR عاری از ویروس بودند، در محیط کشت بهینه تکثیر شدند. تعداد ۴۰ ریزشاخه عاری از ویروس در محیط کشت ریشه‌زایی حاوی نمک‌های MS ۱/۲، فاقد ویتامین، همراه با ۳۰g/l ساکاروز و ۳ میکرو مولار IBA قرار داده شد. در هر ظرف پنج ریزشاخه با طول تقریبی ۴۰ میلی‌متر گذاشته شد، سپس ظروف کشت به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از یک هفته ریز نمونه‌ها به محیط کشت دوم ریشه-

نتایج و بحث

بررسی اولیه تشخیص آلودگی ویروسی در ریزنمونه‌های مادری

پس از گذشت ۶۰ دقیقه از افزودن محلول رنگ‌گیری ویروس-های ASPV و ACLSV به چاهک‌ها و انکوبه کردن پلیت در تاریکی و دمای اتاق ($20-25^{\circ}\text{C}$)، خوانش چاهک‌ها توسط دستگاه ELISA reader انجام شد و اعداد به دست آمده مورد بررسی قرار



شکل ۱- نتایج RT-PCR دو ریز نمونه مادری از سیب گوشت سرخ با آغازگرهای اختصاصی ویروس‌های (A) ASGV، (B) ASPV و (C) ACLSV. اندازه قطعات مورد بررسی ۲۴۷bp (برای ویروس ASPV)، ۲۳۶bp (برای ویروس ASGV) و ۲۱۹bp (برای ویروس ACLSV) بوده است. تصویر نتایج الایزا در پنج نمونه مادری (D).

Figure 1- The result of RT-PCR, in two mother samples of red flesh apple for ASGV (A), ASPV (B) and ACLSV (C). The size of the tested parts was 247 bp (for the ASPV), 236 bp (for the ASGV) and 219 bp (for the ACLSV). The results of ELISA in five mother samples (D).

دیگر در این زمینه (۱۱ و ۲۳) نرخ عاری سازی گیاهان از ویروس به صورت معنی‌داری تحت تأثیر اندازه مریستم قرار داشت و رابطه معکوسی بین اندازه مریستم و درصد عاری سازی ریزنمونه از ویروس برقرار بود. بنابراین هرچه اندازه مریستم کشت شده کوچکتر باشد، شانس بالاتری جهت عاری شدن از ویروس‌ها خواهد داشت.

براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، افزایش طول مدت تیمار گرمادرمانی رابطه مستقیم و معنی‌داری بر عاری شدن ریزشاخه‌های مورد بررسی از سه ویروس ACLSV، ASGV و ASPV داشت. از طرفی قرارگیری طولانی مدت ریزشاخه‌ها در شرایط گرمادرمانی (۲۱ روز) به شدت به ریزنمونه‌ها خسارت وارد کرد، به طوری که تمام ریزشاخه‌های قرار گرفته در تیمار ۲۱ روز گرمادرمانی از بین رفتند. نتایج حاصل در این زمینه مشابه نتایج آزمایشات پژوهش دیگری (۹) بود که عنوان کرده بودند تقریباً تمام ریزنمونه‌های قرار گرفته در تیمار گرمادرمانی ۳۸ درجه، پس از ۲۰ روز از بین رفتند. در پژوهشی (۲۴) آمده است، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های گلایی، پس از گذشت ۳۵ روز گرمادرمانی در ۳۷ درجه سانتیگراد، ۶۴ درصد بود. این اختلاف در نتایج حاصله، می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان مقاومت میزبان به دمای بالا، و همچنین تفاوت در میزان دمای به

نتایج بررسی اثر تیمارها بر حذف ویروس از ریزشاخه‌ها با روش‌های الایزا و RT-PCR

مدت زمان تیمار گرمادرمانی، و اندازه‌ی مریستم جدا شده از ریزشاخه‌ها، اثر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر حذف ویروس‌های ASPV، ASGV، ACLSV از ریزشاخه‌های مورد بررسی داشت.

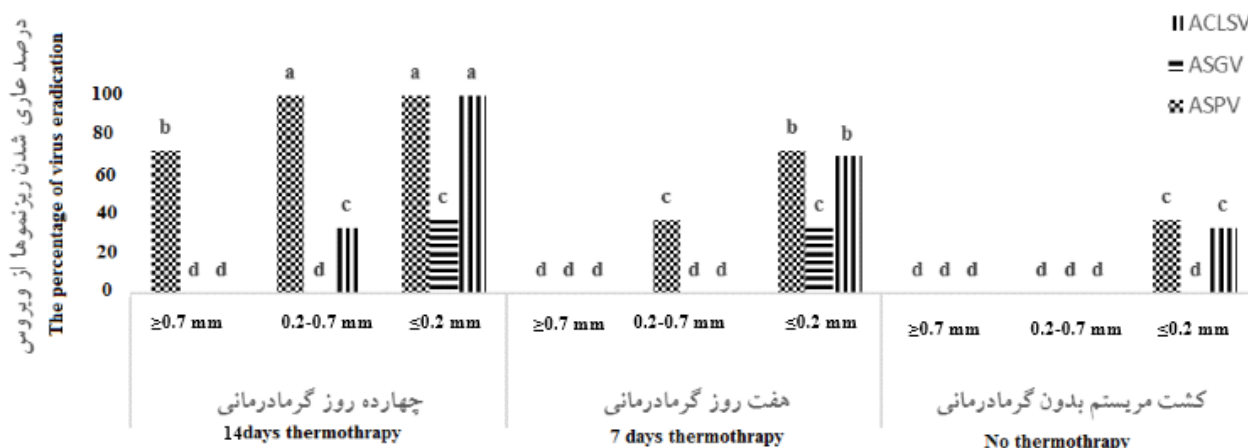
مقایسه میانگین نتایج نشان داد مریستم‌های کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر مؤثرترین تیمار اندازه، جهت حذف ویروس‌های ACLSV (۶۶/۶۷ درصد)، ASGV (۲۲/۲۲ درصد) و ASPV (۶۶/۶۷ درصد) از ریزشاخه‌های مورد مطالعه بوده است. ضعیف‌ترین تیمار این بخش نیز کشت مریستم با اندازه بزرگتر از ۰/۷ میلی‌متر بود که کمترین میزان عاری شدن از ویروس‌های ACLSV (صفر درصد)، ASGV (صفر درصد) و ASPV (۲۲/۲۲ درصد) در آن مشاهده شد. به طور کلی نتایج این بخش نشان داد، مریستم‌های بزرگ‌تر از ۰/۲ میلی‌متر که همراهی پریموردیوم‌های برگ‌ی بیشتری داشتند، شانس زنده‌مانی و رشد جداکشت‌ها را افزایش دادند و این نتیجه در تحقیقات قبلی نیز به دست آمده است (۲۰). اما طبق نتایج این پژوهش و پژوهش‌های

(۱۱/۱۱ درصد) و ASGV (صفر درصد) از ریزشاخه‌ها داشت (شکل ۲).

به طور کلی نتایج این بخش نشان داد، با افزایش طول دوره گرمادرمانی نمونه‌ها پیش از مریستم برداری، میزان عاری شدن گیاهان در هر سه نوع ویروس افزایش یافته است، این نتایج منطبق بر نتایج بسیاری از پژوهش‌های قبلی است که افزایش طول دوره گرمادرمانی را در حذف ویروس بسیار مؤثر می‌دانند (۸ و ۱۷). از طرفی در پژوهش‌ها آمده است، دمای بالا با جلوگیری از ساخت و تکثیر RNA ویروس می‌تواند انتشار ویروس به مریستم انتهایی را کاهش دهد (۱۸، ۲۳ و ۲۵). بدیهی است که توان ارقام و گونه‌های مختلف در زمینه امکان رشد و نمو در شرایط گرمادرمانی متفاوت است و با توجه به نتایج، تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی بهترین تیمار پژوهش حاضر در زمینه حذف ویروس از ریزنمونه‌های مورد آزمایش بود، که ضمن حفظ تعداد قابل ملاحظه‌ای از ریزنمونه‌ها، بیشترین نرخ عاری شدن از ویروس‌های مورد مطالعه را نشان داد.

کارگرفته شده جهت تیمار گرمادرمانی باشد. در پژوهشی (۲۳) در ارتباط با ریزنمونه‌های گلابی Fengshui آمده است، تعدادی از گیاهچه‌ها پس از ۱۵ روز گرمادرمانی از بین رفتند، و در ادامه آزمایش میزان از دست رفتن ریزنمونه‌ها با افزایش دوره گرمادرمانی به شدت افزایش یافت.

مقایسه میانگین نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد تیمارهای ۱۴ روزه (۴۴/۴۴ درصد) گرمادرمانی اثر مناسبی بر حذف ویروس ACLS از ریزشاخه‌ها داشته است و درصد قابل توجهی از ریزشاخه‌های مورد مطالعه در تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی (۸۸/۸۹ درصد) از ویروس ASP درصد عاری شدند. تفاوت معنی‌داری بین دوره‌های ۷ و ۱۴ روزه گرمادرمانی (۱۱/۱۱ درصد) جهت حذف ویروس ASGV از ریزشاخه‌های مورد بررسی مشاهده نشد (شکل ۲). این امر می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت کم ویروس ASGV به افزایش طول مدت گرمادرمانی باشد. تیمار کشت مریستم به تنهایی (تیمار شاهد) راندمان بسیار پایین در حذف ویروس‌های ACLSV (صفر درصد)، ASPV



شکل ۲- درصد عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV در پایان دوره گرمادرمانی و پس از هشت ماه از کشت مریستم گیاهچه‌های *Malus pumila* Mill.

Figure 2- The percentage of ASPV, ACLSV and ASGV elimination at the end of thermotherapy treatments after eight months of meristem culture of *Malus pumila* Mill. Explants (DMRT, $p \leq 0.01$)

پژوهش‌های پیشین (۲، ۱۱ و ۱۳)، الایزا از دقت کافی جهت ردیابی ویروس برخوردار نبود و برای دسترسی به نتیجه مناسب، استفاده از روش‌های دقیق‌تر مانند RT-PCR توصیه می‌شود.

نتایج RT-PCR نشان داد، نرخ حذف سه ویروس ACLSV (۲۵/۹ درصد)، ASGV (۷/۴ درصد) و ASPV (۴۴/۴ درصد) در گیاه با یکدیگر متفاوت بود. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت ساختار ویروس‌ها و سرعت حرکت ذرات پروتئین ویروس و عوامل مؤثر بر انتقال ویروس در سلول‌های گیاهی باشد که در پژوهش‌های گذشته نیز بررسی و تایید شده است (۲۲).

نتایج آزمون الایزا در ریزشاخه‌های حاصل از مریستم کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، پس از ۱۴ روز گرمادرمانی در جدول (۲) آمده است. نتایج اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های سالم و آلوده به ویروس (با استناد به نتایج RT-PCR) را نشان نداد. به طور کلی نتایج به دست آمده از آزمون الایزا در این پژوهش، با نتایج RT-PCR هم‌خوانی نداشت و قابل تفسیر نبود. در تعدادی از ریزشاخه‌ها با اینکه عدد حاصل از آزمون الایزا، از کنترل منفی بالاتر بود، اما نتیجه RT-PCR نمونه را عاری از ویروس نشان داد، و در برخی موارد نتایج آزمون الایزا مثبت کاذب بود و این نمونه‌ها در روش RT-PCR سالم تشخیص داده شدند. بنابراین با توجه به نتایج این بخش (جدول ۲) و

جدول ۲- نتایج بررسی وجود ویروس‌های ASPV، ACLSV و ASGV سیب با استفاده از تکنیک الایزا (بررسی شده در OD 405/492nm) و RT-PCR در پنج ریز نمونه مادری و ریز نمونه‌های رشد یافته از مریستم (کوچک‌تر از ۲/۰ میلی‌متر) پس از ۱۴ روز گرمادرمانی در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد.

Table 2- The results of the presence of ASPV, ACLSV, and ASGV viruses by using ELISA (tested in OD 405 / 492nm) and RT-PCR in five maternal explants and meristem grown explants (0.2 mm $\geq$) after 14 days of thermotherapy at 38°C.

نوع ویروس virus	نوع نمونه مورد بررسی Type of examined sample	ریز نمونه ۱ Explants 1	ریز نمونه ۲ Explants 2	ریز نمونه ۳ Explants 3	ریز نمونه ۴ Explants 4	ریز نمونه ۵ Explants 5
ACLS	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.140	0.160	0.160	0.202	0.243
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	+	+
	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems ^a	0.122	0.118	0.165	0.160	0.153
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	-	+	+	-
	کنترل مثبت ACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفی ACLSV Negative control of ACLSV	0.110	0.110	0.110	0.110	0.110
	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.168	0.202	0.247	0.174	0.184
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	+	+
ASG	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems ^a	0.116	0.147	0.261	0.142	0.180
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	+	+	-	+
	کنترل مثبت ACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفی ACLSV Negative control of ACLSV	0.110	0.110	0.110	0.110	0.110
	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.179	0.234	0.348	0.245	0.320
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	-	-
	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems ^a	0.120	0.183	0.273	0.203	0.105
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	-	-	-	-
ASP	کنترل مثبت ACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفی ACLSV Negative control of ACLSV	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150
	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.179	0.234	0.348	0.245	0.320
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	-	-
	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems ^a	0.120	0.183	0.273	0.203	0.105
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	-	-	-	-
	کنترل مثبت ACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفی ACLSV Negative control of ACLSV	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150

از طرفی براساس نتایج پژوهش‌های پیشین که در گیاه گلابی صورت گرفت، ویروس ACLSV پس از ۳۳ روز گرمادرمانی حذف شد

های گیاهی گزارش شده است (۹ و ۱۱).

تولید نهال عاری از سه ویروس ASPV، ACLSV و ASGV

در انتها ۸۶ درصد از ریزنمونه‌های عاری از سه ویروس ASPV، ASGV و ACLSV ریشه‌دار شدند. ۹۵ درصد از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند (شکل ۳). یک سال بعد عدم حضور ویروس در گیاهان گلدانی با تکنیک RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴) و تمامی گیاهان مورد بررسی عاری از آلودگی به ویروس‌های مورد مطالعه بودند.

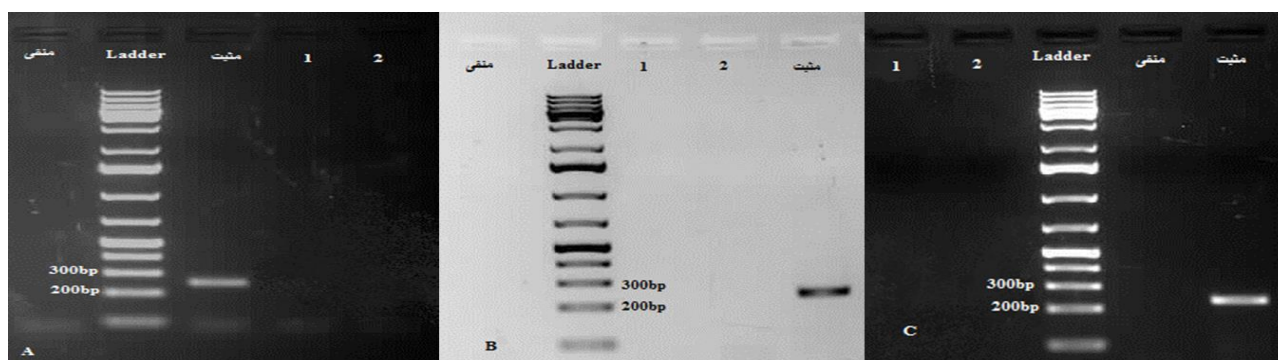
اما غلظت ویروس ASGV (با تکنیک الایزا) نزدیک به نمونه مثبت بود (۳)، در مطالعه دیگری نیز (۲۴) آمده است ACLSV نسبت به دماهای بالا حساس‌تر از ASGV بود، نتایج مذکور با نتایج حاصل از این پژوهش، مشابهت داشت و حذف ویروس ASGV در ریزشاخه‌های سیب گوشت سرخ سخت‌تر از حذف ویروس ACLSV انجام شد.

به‌طور کلی در بین ویروس‌های مورد مطالعه در این پژوهش، ویروس ASPV نرخ حذف بالاتری نسبت به ویروس‌های ACLSV و ASGV داشت. در تأیید نتایج حاصل از این پژوهش، در پژوهش‌های قبلی نیز کارآمدی متفاوت حذف این سه ویروس از ریزشاخه‌



شکل ۳- میوه سیب گوشت سرخ (A)، ریزنمونه رشد یافته از مریستم (B1)، پرآوری شاخه (B2)، مرحله ریشه‌زایی (C)، و تعدادی از نهال‌های سازگار شده عاری از سه ویروس ASPV، ACLSV و ASGV (D)

Figure 3- Fruit of red flesh apple (A), a grown up explant from meristem (B1), *in vitro* shoot multiplication (B2), rooting stage (C) and a number of adapted virus-free seedlings from ASPV, ACLSV and ASGV (D)



شکل ۴- نتیجه RT-PCR دو نمونه نهال گلدانی سیب گوشت سرخ عاری از ویروس‌های (A) ACLSV، (B) ASPV، و (C) ASGV

Figure 4- The result of RT-PCR, in tow red flesh apple seedlings, free from ASPV, ACLSV and ASGV

نتایج حاصل از RT-PCR مغایرت داشت. تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی به همراه اندازه یک مریستم برداری (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر) موثرترین تیمار در عاری شدن ریزشاخه‌های مورد مطالعه از سه ویروس ACLS (۱۰۰ درصد)، ASG (۳۷ درصد) و ASP (۱۰۰ درصد) بود.

نتیجه‌گیری

بررسی اولیه گیاهان مادری با روش مولکولی RT-PCR نشان داد تمام نمونه‌های مادری مورد بررسی، به ویروس‌های ASP، ASG و ACLS آلودگی داشتند. طول دوره تیمار گرمادرمانی (۳۸ درجه سانتی‌گراد) و اندازه‌ی مریستم کشت شده از ریز نمونه‌ها، اثر معنی‌داری ($P < 0/01$) بر حذف سه ویروس ASPV، ACLSV و ASGV داشت. روش الایزا از دقت کافی جهت ردیابی ویروس برخوردار نبود و در بسیاری از موارد نتایج به‌دست آمده از این روش با

منابع

- 1- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., and Fauquet C. M. 2004. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149(8): 1045-1060.
- 2- Asghar A., and Singh G. 2007. Production of *Indian citrus ringspot virus* free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal of Central European Agriculture* 8(1).
- 3- Cies'lin'ska M. 2002. Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulture* 596: 481-484.
- 4- Deng X.Y., Hong N., Hu H.J., and Wang G.P. 2004. Detection of latent viruses in *Pyrus pyrifolia* by IC-RT-PCR and TC-RT-PCR. *Journal of Fruit Science* 21: 569-572.
- 5- Etherton P. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Journal of Medicine* 113: 71-88.
- 6- Gambino G., Di Matteo D., and Griboaud I. 2009. Elimination of *Grapevine fanleaf virus* from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *European Journal of Plant Pathology* 123(1): 57-60.
- 7- Hadidi A., and Barba M. 2011. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. *Virus and Virus Like Diseases of Pome and Stone Fruits* 1(8).
- 8- Hu G.J., Hong N., Wang L.P., Hu H.J., and Wang G.P. 2012. Efficacy of virus elimination from *in vitro*-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Protection* 37: 20-25.
- 9- Hu G., Dong Y., Zhang Z., Fan X., Ren F., and Zhou J. 2015. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 121(2): 435-443.
- 10- Kazemi N., Amiri M.E., and Jafarkhani Kermani M. 2013. Hormonal optimization of medium for multiplication of rare apple genotype of Red Flesh. Thesis for M. Sc. in Horticulture. University of Zanjan.
- 11- Kazemi N., Zaree Nahandi F., Habashi A.A., and Asadi W. 2019. Molecular Assessment of Chemotherapy and Meristem Culture Efficiency for Production of Seven Cultivars of Virus-Free Pear (*Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural Crops Production* 21(1): 107-118.
- 12- Komorowska B., Malinowski T., and Michalczyk L. 2010. Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of *Apple stem pitting virus*. *Journal of Virological Methods* 168(1-2): 242-247.
- 13- Manganaris G.A., Economou A.S., Boubourakas I.N., and Katis N.I. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports* 22(3): 195-200.
- 14- Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari L., Khayam Nekouei R., and Aalami A. 2016. A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. *Protoc Exch.*
- 15- Mathioudakis M.M., Maliogka V.I., Dovas C.I., Paunović S., and Katis N.I. 2008. Reliable RT-PCR detection of *Apple stem pitting virus* in pome fruits and its association with quince fruit deformation disease. *Plant Pathology* 58(2): 228-236.
- 16- Menzel W., Jelkmann W., and Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99(1-2): 81-92.
- 17- Panattoni A., Luvisi A., and Triolo E. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research* (1): 173-188.
- 18- Paprstein F., Sedlak J., Polak J., Svobodova L., Hassan M., and Bryxiova M. 2008. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94(3): 347-352.
- 19- Paprstein F., Sedlak J., Svobodová L., Polák J., and Gadiou S. 2013. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance. *Horticultural Science (Prague)* 40: 186-190.
- 20- Ramgareeb S., Snyman S.J., Van Antwerpen T., and Rutherford R.S. 2009. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum spp.* cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 100(2): 175-181.
- 21- Rethesh S.T., and Bhat A.I. 2010. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. *Crop Protection* 29(10): 1214-1217.
- 22- Sareila O., Hohkuri M., Wahlroos T., and Susi P. 2004. Role of viral movement and coat proteins and RNA in phloem-dependent movement and phloem unloading of tobamoviruses. *Journal of Phytopathology* 152(11-12): 622-629.
- 23- Tan R., Wang L., Hong N., and Wang G. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 101(2): 229-235.
- 24- Wang L., Wang G., Hong N., Tang R., Deng X., and Zhang H. 2006. Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for *in vitro*-cultured pear shoot tips. *HortScience* 41(3): 729-732.
- 25- Wang Q., Cuellar W.J., Rajamaki M.L., Hirata Y., and Valkonen J.P. 2008. Combined thermotherapy and

cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9(2): 237-250.



Evaluation of Combined Treatments of Thermotherapy and Apical Meristem Culture Efficiency on Virus Elimination from *in vitro* Shootlets of Red Flesh Apple (*Malus pumila* Mill.)

N. Kazemi^{1*} - A.A. Habashi² - W. Asadi³

Received: 26-12-2018

Accepted: 31-07-2019

Introduction: Apple (*Malus spp.*) is one of the most economically important fruit crop worldwide. This crop is highly affected by various virus infections, leading its considerable devastation and eventually results in yield loss in the whole world. Among effective viruses, *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) which have been firstly characterized in apple (*Malus domestica*), play important roles in altering the plant defense mechanism, leading a low performance. According to the references, heat treatments can reduce the movement of virus particles into the apical meristem through inhibiting viral RNA synthesis, so high temperature over a long period is an efficient method for virus elimination. In additions, meristem culture is also a common method to eradicate viruses from horticultural plants. This study was done to produce virus-free (ACLSV, ASPV, ASGV) apple (*Malus pumila* Mill.) plantlets.

Materials and Methods: The effect of different thermotherapy duration (0, 7, 14 and 21 days at 38 °C) and the sizes of apical meristems for meristem culture (less than 0.2 mm, between 0.2 and 0.7 mm and larger than 0.7 mm) was assessed on virus eradication. Our plant material was a genotype of red flesh apple belongs to Budagovsky Bud.9 (*Malus+pumila*) "Niedzwetzkyana" of *Rosaceae* family from Shahroud, that has high levels of important phytochemicals like antioxidants, flavonoids and anthocyanins in its cortex, which in addition to attractiveness, creating special healing properties in some disease. At first the presence of ACLSV, ASGV and ASPV were checked in mother samples by ELISA and RT-PCR methods. Then we performed the thermotherapy treatments and later meristems were cultivated and grown *in vitro*. Regenerated shoots from meristem were tested by ELISA and RT-PCR methods for all three viruses. Samples that were diagnosed virus-free by both techniques, were proliferated, rooted and transferred into the pots to be used for later propagation and establishment of the mother orchard.

Results and Discussion ELISA results for the presence or absence of ACLSV, ASGV and ASPV were indeterminate; they were neither negative nor positive for each virus, indicating ELISA was not an accurate method to study virus infections in our samples. Therefore, careful examination of initial infection of samples was performed by RT-PCR. Examining mother samples by RT-PCR showed that all samples were infected by ASG, ASP and ACLS viruses.

Results of RT-PCR testing suggested that the number of days in thermotherapy and the size of meristem had a significant effect ($P<0.01$) on the ACLSV, ASGV and ASPV elimination. Increasing in the duration of the thermotherapy decreased the survival rate of the explants and it was difficult to acquire virus-free explants after 21 days treatments, because all the explants were destroyed in this treatment. The relation between the size of meristem and its survival has been examined in different studies, whose results are consistent with the present research and confirms that increasing the size of the meristem and the number of leaf primordium, will increase the vitality. However, it should be noted that larger meristems are more susceptible to viral contamination. In the previous study, the percentage of ASGV and ACLSV elimination was significantly influenced by the size of the meristem and the duration of the thermotherapy. In the same study, ACLSV, ASGV and ASPV could not be detected in plants grown from meristems smaller than 1 mm after 35 days of thermotherapy. They also showed that virus eradication was happened after shorter period of thermotherapy if smaller meristems were cultured (0.7 mm). The results of our study were consistent with these observations; ACLSV, ASGV and ASPV appeared to be eliminated more frequently from the smallest meristem treatment (smaller than 0.2 mm) compared to the other treatments (0.2-0.7 mm and larger than 0.7 mm). Elimination rates of ACLSV, ASGV and ASPV were different in each case and ASPV-free frequency obtained in regenerated shoots treatment was higher than other viruses (ASGV and ACLSV). This observation was similar to the results of

1- Researcher of Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(*- Corresponding Author Email: nooshinkazemi792000@yahoo.com)

2- Departement of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Ph.D. Student National Institute of Grape and Raisin in Malayer University, Iran

some previous studies. It could be due to differences in the morphology of the viruses and transmission factors in plant cells that affect viruses, which has been investigated and confirmed in previous studies.

Meristem culture alone, without other treatments, had very low efficiency in virus elimination from explants. The best results of virus eradication from apple explants was obtained after 14 days of thermotherapy, that we had 44.44%, 11.11% and 88.89% of virus-free samples from ACLSV, ASGV and ASPV, respectively. Generally, our results showed that by increasing the thermotherapy duration, the elimination of all three types of viruses was increased. Many researchers also found that thermotherapy is a very effective treatment in virus eradication.

Conclusion: Results showed that increasing the duration of thermotherapy (14 days) and reducing the size of cultivated meristem (smaller than 0.2mm) increased the elimination rate of all three viruses (ACLSV, ASPV, ASGV) from apple explants.

Keywords: *Apple chlorotic leaf spot virus, Apple stem grooving virus, Apple stem pitting virus, ELISA, RT-PCR*



اثر غنچه‌گیری، محلول‌پاشی نیتروژن و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات رویشی و زایشی گل جعفری

محبوبه زمانی پور*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۵

چکیده

این مطالعه با هدف بهبود ویژگی‌های رویشی و زایشی بر روی گیاهچه‌های گل جعفری آفریقایی در قالب دو آزمایش جداگانه در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ولایت ایرانشهر در سال ۱۳۹۶ اجرا شد. تیمارهای آزمایش اول شامل غنچه‌گیری در دو سطح (عدم غنچه‌گیری و غنچه‌گیری در ۲۰ روز بعد از کاشت) و نیتروژن در چهار سطح (۰ درصد، ۲ درصد، ۴ درصد و ۶ درصد) و تیمارهای آزمایش دوم شامل سه سطح ایندول استیک اسید (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر) و سه سطح اسید جیبرلیک (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر) و آب مقطر به عنوان شاهد بودند. کیفیت گیاهچه‌ها بر اساس ارتفاع و قطر گیاهچه، تعداد برگ، تعداد و طول شاخه فرعی، تعداد و قطر گل، وزن تر و خشک گل و تعداد روز تا گلدهی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که بیشترین ارتفاع گیاه (۴۷/۵ سانتی متر)، طول شاخه (۲۱/۵۰ سانتی متر)، قطر گل (۵/۲۵ سانتی متر)، وزن خشک گل (۳/۶۰ گرم) و وزن تر گل (۰/۸ گرم) در تیمار عدم غنچه‌گیری به همراه ۶ درصد نیتروژن بدست آمد. بیشترین تعداد برگ (۹۱)، تعداد شاخه (۱۰) و تعداد گل (۷) با غنچه‌گیری همراه با تیمار ۶ درصد نیتروژن بدست آمد. کیفیت گیاهچه‌ها با محلول‌پاشی اسید جیبرلیک نسبت به ایندول استیک اسید افزایش چشمگیری داشت و با افزایش غلظت، کیفیت گیاهچه‌ها نیز افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین ارتفاع گیاه (۳۴/۲۵ سانتی متر)، طول شاخه (۲۳ سانتی متر)، تعداد برگ (۴۲)، تعداد شاخه (۱۴)، قطر گل (۳ سانتی متر)، وزن خشک گل (۰/۶۵ گرم)، وزن تر گل (۳/۱۳ گرم)، تعداد گل (۶) و کمترین تعداد روز تا گلدهی (۳۱ روز) در محلول‌پاشی با اسید جیبرلیک در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر ایجاد گردید.

واژه‌های کلیدی: اسید جیبرلیک، ایندول استیک اسید، اوره، کیفیت گیاهچه

مقدمه

چینی و داوودی مشخص شده است (۶). غنچه‌گیری به منظور شاخه‌دهی بیشتر بوده که این امر تعداد گل‌ها را نیز افزایش می‌دهد. یک گیاه به طور کلی به دلیل غالبیت انتهایی به سمت بالا رشد می‌نماید. اگر نوک شاخه چیده شود، مواد غذایی به سمت شاخه‌های جانبی رفته و شاخه‌دهی انجام می‌پذیرد. بدون تیمار غنچه‌گیری، رشد گیاه تسریع شده و گیاه طویل‌تر گشته و بنابراین عملکرد کاهش می‌یابد (۱). سهرافات و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که تعداد گل در ارتباط با تعداد شاخه بوده و افزایش تعداد شاخه سبب افزایش تعداد گل‌های جعفری شده است. باج و همکاران (۱) گزارش نمودند که بهترین زمان غنچه‌گیری، ۱۵ روز بعد از کاشت است، چرا که ماده خشک بیشتری در این زمان توسط گیاه تولید شده و جذب نیتروژن و فسفر از خاک در این زمان نیز بیشتر است. بعلاوه، آن‌ها بیان کردند که غنچه‌گیری زودهنگام سبب افزایش تعداد شاخه و افزایش تعداد گل می‌گردد. هم چنین، پوشکار و سینگ (۲۱) گزارش نمودند که غنچه‌گیری ۲۰ روز بعد از کاشت نسبت به تیمارهای دیگر به منظور افزایش تعداد گل موثرتر بود. از طرفی، نیتروژن موثر بر رشد، تولید و

گل جعفری آفریقایی که عضوی از خانواده کلاپرک‌سانان است، یکی از محبوب‌ترین گل‌های تجاری یکساله در اغلب کشورها می‌باشد. این گیاه به دلیل کاشت آسان، مقاومت به آفات و سازگاری وسیع در شرایط دمایی مختلف از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است (۱). از این گیاه در طراحی منظر به دلیل گل‌های جذاب و طیف رنگی گسترده آن استفاده می‌شود (۲۰). در اغلب گل‌های زینتی، گلدهی و عملکرد بستگی به تعداد شاخه‌های باردهی دارد که با کاهش رشد و افزایش شاخه‌های جانبی، افزایش می‌یابد (۲۵). پیرایش گیاه توسط غنچه‌گیری در گل‌های زینتی انجام می‌گیرد. زمان بهینه و شدت غنچه‌گیری توسط محققان مختلف در گل‌هایی مانند جعفری، مینای

۱- استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه ولایت، ایرانشهر، ایران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: m.zamanipour@velayat.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.79030

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ولایت ایرانشهر در قالب دو آزمایش جداگانه در دی ماه سال ۱۳۹۶ اجرا شد. خاک گلخانه شنی لومی با pH برابر ۷/۲ بود. طول جغرافیایی منطقه بین ۵۸ درجه و ۴۷ دقیقه تا ۶۳ درجه و ۱۹ دقیقه، عرض جغرافیایی بین ۲۵ درجه و ۳ دقیقه تا ۳۱ درجه و ۲۸ دقیقه و ارتفاع منطقه از سطح دریا ۵۷۱ متر بود. ۱۰/۵ کیلوگرم کود دامی، ۱۵ گرم نیتروژن، ۲۰ گرم فسفر و ۲۰ گرم پتاسیم در بلوک‌های مورد آزمایش قبل از کاشت اعمال شدند. پس از آماده سازی بستر با ترکیب خاک و کود دامی، بذور گیاه جعفری آفریقایی رقم African Double Orange در بسترها به فاصله ۱۰ سانتی متر بین ردیف و ۲ تا ۳ سانتی متر روی ردیف کاشته شدند. انتقال نشای گیاهچه در مرحله ۳ تا ۴ برگی در فواصل ۴۵ سانتی متر $\times$ ۳۵ سانتی متر انجام گرفت (۱).

آزمایش اول: اثرات غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر ویژگی‌های رشدی و زایشی گل جعفری

تیمارها شامل غنچه‌گیری در ۲ سطح (عدم غنچه‌گیری و غنچه‌گیری ۲۰ روز پس از کاشت) و محلول‌پاشی نیتروژن در ۴ سطح (۰ درصد، ۲ درصد، ۴ درصد و ۶ درصد) بودند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه اجرا شد. غنچه‌گیری با حذف ۴ تا ۵ سانتی متر از قسمت انتهایی نوک شاخه، ۲۰ روز پس از کاشت انجام گرفت. از اوره به عنوان محلول‌پاشی نیتروژن یک روز پس از غنچه‌گیری استفاده شد.

آزمایش دوم: اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ویژگی‌های رشدی و زایشی گل جعفری

تیمارها شامل ۳ سطح اسید جیبرلیک (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر) و ۳ سطح ایندول استیک اسید (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر) و آب مقطر به عنوان شاهد بودند. اولین مرحله محلول‌پاشی اکسین و جیبرلین، ۲۰ روز بعد از کاشت و دومین مرحله محلول‌پاشی، ۵۰ روز بعد از کاشت انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه اجرا شد.

فاکتورهای اندازه‌گیری شده

در زمان برداشت (یعنی زمانی که آخرین گل برداشت شد)، فاکتورهای اندازه‌گیری شده شامل صفات رویشی (ارتفاع و قطر گیاه، تعداد شاخه، تعداد برگ و میانگین طول شاخه‌ها) و صفات زایشی

بهبود کیفیت گل‌های جعفری می‌باشد (۱۶). در بین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، اکسین و جیبرلین نقش حیاتی در تنظیم فرآیندهای توسعه در گل جعفری دارند (۷). اکسین در افزایش طول‌شدن سلول به ویژه شاخه‌ها و القای غالبیت انتهایی نقش دارد، اما غلظت‌های بالای اکسین بازدارنده آن می‌باشد (۲ و ۸). بنابراین، تنها غلظت‌های پایین اکسین در افزایش رشد، موثر می‌باشند (۳۳). بعلاوه، ایندول استیک اسید سبب افزایش تقسیم سلولی، رشد شاخه و ریخت‌زایی سلولی می‌گردد (۱۴). جیبرلین به رشد ساقه، برگ و دیگر بخش‌های هوایی گیاه کمک نموده و سبب طول‌شدن سلول و افزایش طول میان‌گره‌ها می‌شود (۲). بعلاوه، محلول‌پاشی با اسید جیبرلیک تعداد گل در هر گیاه، وزن و عملکرد گل و طول ساقه و طول اسپات را در گیاه آنتوریوم افزایش داد (۵ و ۱۱). افزایش گلدهی و کیفیت گل‌های میخک نیز می‌تواند به وسیله کاربرد خارجی هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید و اسید جیبرلیک به واسطه تقسیم سلول و طول‌شدن سلول در قسمت انتهایی گیاه روی دهد (۱۴). خوندوس و همکاران (۹) در بررسی اثرات نفتالین استیک اسید، سایکوسل و اسید جیبرلیک بر خصوصیات زایشی گل همیشه بهار بیان نمودند که بالاترین تعداد و کیفیت گل در غلظت‌های ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمد. ساجید و همکاران (۲۴) و کومار و همکاران (۱۳) در بررسی اثرات غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و سایکوسل بیان نمودند که غلظت‌های ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب سبب افزایش ارتفاع گیاه، تعداد شاخه، تعداد برگ و تعداد گل‌های داوودی و جعفری شد و تعداد روز تا گلدهی را کاهش داد. کومار و همکاران (۱۵) در بررسی کاربرد خاکی نیتروژن به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار به همراه کاربرد برگی اسید جیبرلیک به میزان ۲۰۰ پی پی ام در ۲۰ و ۵۰ روز پس از کاشت در گل جعفری گزارش نمودند که تمامی پارامترهای رویشی و زایشی اندازه‌گیری شده، افزایش یافت. باج و همکاران (۱) گزارش نمودند که محتوای نیتروژن، پتاسیم و فسفر گیاه جعفری با کاربرد ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک به همراه غنچه‌گیری در ۱۵ روز پس از کاشت افزایش یافت. سینگ و همکاران (۳۱) در بررسی غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر کیفیت گیاهچه جعفری بیان نمودند که کاربرد غلظت ۳ درصد نیتروژن سبب افزایش ارتفاع، وزن خشک گل و قطر گل شدند، در حالی که غلظت ۲ درصد نیتروژن سبب افزایش وزن تر گل شد. بعلاوه، تعداد برگ در غلظت ۱ درصد نیتروژن به همراه غنچه‌گیری افزایش یافت. این مطالعه با هدف بررسی اثرات غنچه‌گیری، محلول‌پاشی نیتروژن و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر خصوصیات رشدی و زایشی گل جعفری انجام گرفته است.

(تعداد گل، قطر گل، وزن خشک و وزن تر گل) بودند. تعداد روز تا گلدهی از تاریخ کاشت تا روز باز شدن جوانه‌های گل محاسبه شد. برای به حداقل رساندن کاهش وزن گل ابتدا وزن تر با ترازوی دیجیتالی (۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک آن‌ها به آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت منتقل شدند و پس از گذشت این زمان با ترازوی دیجیتالی وزن شدند.

آنالیز داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS و MSTATC تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول

پارامترهای رشدی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر ارتفاع، تعداد شاخه، تعداد برگ، قطر ساقه و طول هر شاخه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱).

تأثیر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر ارتفاع و قطر

گیاه

غنچه‌گیری اثر معنی‌داری بر پارامترهای رشدی گل جعفری داشت، به طوری که ارتفاع و قطر گیاه را نسبت به سایر تیمارها کاهش چشمگیری داد. برعکس، تیمارهای نیتروژن همگی سبب افزایش ارتفاع و قطر گشتند، به گونه‌ای که بالاترین میزان ارتفاع (۴۷/۵ سانتی‌متر) و قطر گیاه (۲/۵۰ سانتی‌متر) در محلول‌پاشی ۶ درصد نیتروژن بدون عمل غنچه‌گیری و کمترین میزان ارتفاع (۱۹/۸۳ سانتی‌متر) و قطر گیاه (۰/۵ سانتی‌متر) در تیمار غنچه‌گیری به‌تنهایی بدست آمد (شکل ۱ و ۲). افزایش در ارتفاع توسط تیمارهای نیتروژن به اثر مثبت محلول‌پاشی نیتروژن در غلبه انتهایی و رشد طولی گیاه مربوط می‌گردد. بعلاوه نیتروژن سبب تشکیل کلروفیل و پروتئین در گیاه می‌شود. نتایج مشابهی توسط ساسیکومار و همکاران (۲۵) و پراکاش و همکاران (۲۰) بدست آمد.

تأثیر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر تعداد

شاخه‌های فرعی و تعداد برگ

تعداد شاخه‌های فرعی هر گیاه در بین تیمارها به‌طور معنی‌داری متفاوت بود و تیمارهای غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن نسبت به شاهد، تعداد شاخه فرعی بالاتری را ایجاد نمودند. با افزایش غلظت نیتروژن، تعداد شاخه‌های فرعی افزایش یافت، به گونه‌ای که بیشترین تعداد (۱۰) در تیمار ۶ درصد نیتروژن به همراه غنچه‌گیری به‌دست آمد (شکل ۳).

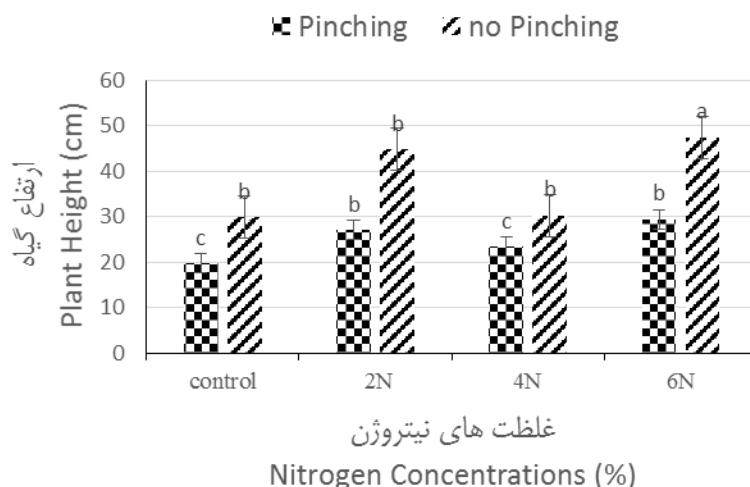
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر صفات رشدی گل جعفری

Table 1- ANOVA results of pinching and nitrogen spraying effect on vegetative traits of African marigold

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	ارتفاع Height	تعداد شاخه Branch number	تعداد برگ Leaf number	قطر ساقه Stalk diameter	طول شاخه Branch length
تکرار Replication	2	0.10 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.025 ^{ns}	6.40 ^{ns}
غنچه‌گیری Pinching	1	1036.70 ^{**}	73.50 ^{**}	13208.00 ^{**}	8.967 ^{**}	520.3 ^{**}
درصد نیتروژن Nitrogen percent	3	218.80 ^{**}	43.00 ^{**}	1246.00 ^{**}	0.472 ^{**}	91.20 ^{**}
غنچه‌گیری × درصد نیتروژن Pinching × Nitrogen percent	3	97.70 ^{**}	14.50 ^{**}	969.00 ^{**}	0.376 ^{**}	47.8 ^{**}
خطا Error	14	0.070	0.700	1.000	0.208	0.100
ضریب تغییرات CV (%)	-	3.40	9.63	2.76	4.3	6.15

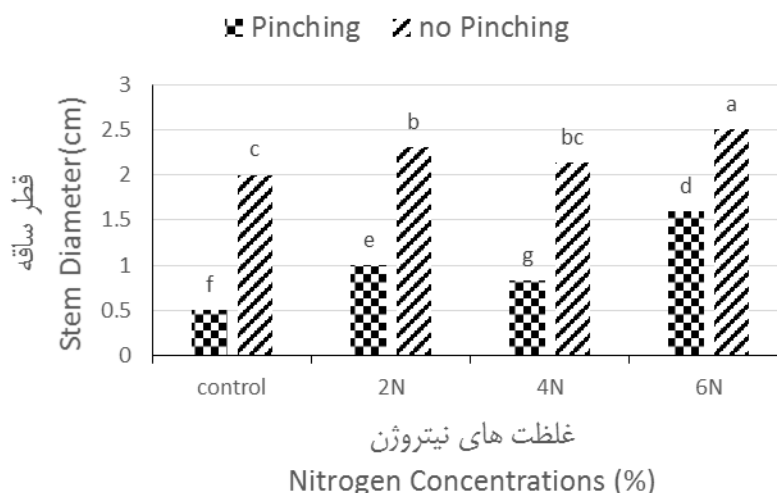
^{**} و ^{ns} به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد، و عدم معنی‌داری

^{**} and ^{ns}: significant at 1% of probability level and non-significant, respectively.



شکل ۱- اثر متقابل محلول پاشی نیتروژن × غنچه گیری بر ارتفاع گل جعفری

Figure 1- Interaction effect of nitrogen spraying × pinching on plant height of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)



شکل ۲- اثر متقابل محلول پاشی نیتروژن × غنچه گیری بر قطر ساقه گل جعفری

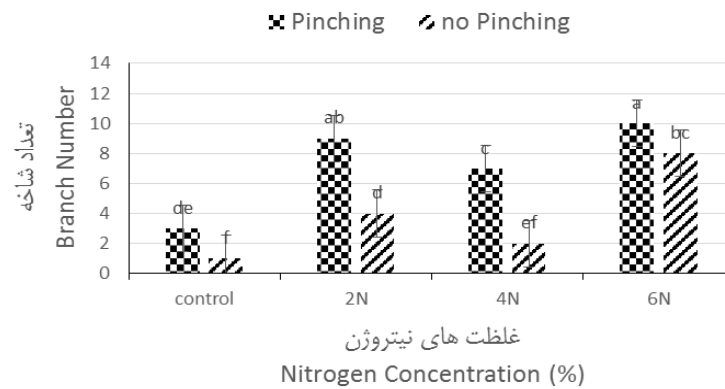
Figure 2- Interaction effect of nitrogen spraying × pinching on flower stem diameter of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)

تعداد برگ‌ها ممکن است به دلیل افزایش در شاخه‌دهی ثانویه و اثر مثبت محلول پاشی نیتروژن باشد. این نتایج با یافته‌های مینا و همکاران (۱۷)، پراکش و همکاران (۲۰) و سینگ و همکاران (۳۱) مطابقت دارد.

تأثیر غنچه‌گیری و محلول پاشی نیتروژن بر طول شاخه

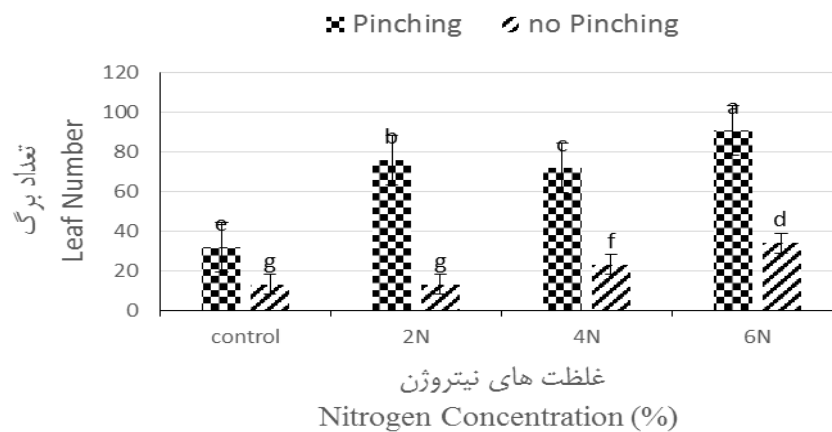
طول هر شاخه در همه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد و بیشترین طول (۲۱/۵ سانتی‌متر) در تیمار ۶ درصد نیتروژن بدون عمل غنچه‌گیری ایجاد شد (شکل ۵).

افزایش در تعداد شاخه‌های فرعی هر گیاه ممکن است به دلیل اثرات توأم حذف جوانه انتهایی گیاه و محلول پاشی برگی نیتروژن باشد. هنگامی که جوانه‌های انتهایی حذف می‌شوند، غلظت ایندول استیک اسید کاهش یافته که به نوبه خود غلبه انتهایی از بین رفته و این امر سبب تشویق جوانه‌های جانبی به رشد و ایجاد شاخه‌های جدید می‌گردد. از طرفی، نیتروژن سبب سنتز آمینواسید، آلکالوئید و پروتوپلاسم در گیاه می‌شود که به افزایش تعداد شاخه جانبی کمک می‌نماید. تعداد برگ‌های هر گیاه در همه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد و بیشترین تعداد (۹۱) در تیمار ۶ درصد نیتروژن به همراه غنچه‌گیری ایجاد گردید (شکل ۴). این افزایش در



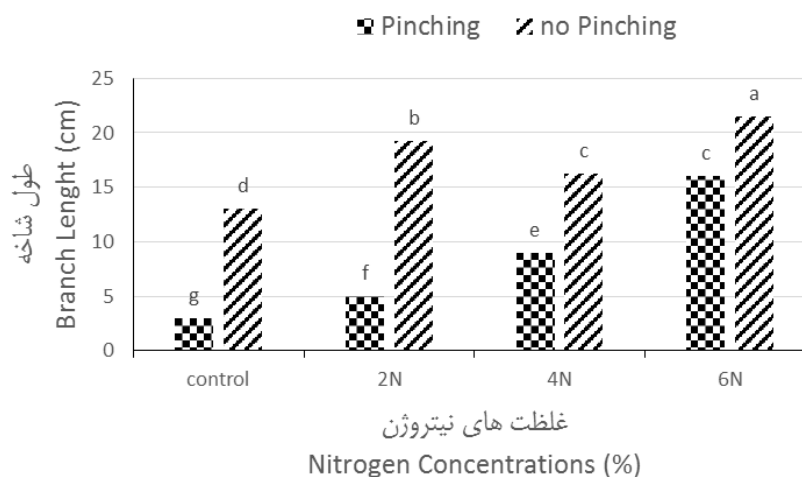
شکل ۳- اثر متقابل محلول‌پاشی نیتروژن × غنچه‌گیری بر تعداد شاخه گل جعفری

Figure 3- Interaction effect of nitrogen spraying × pinching on branch number of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)



شکل ۴- اثر متقابل محلول‌پاشی نیتروژن × غنچه‌گیری بر تعداد برگ گل جعفری.

Figure 4- Interaction effect of nitrogen spraying × pinching on leaf number of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)



شکل ۵- اثر متقابل محلول‌پاشی نیتروژن × غنچه‌گیری بر طول شاخه گل جعفری

Figure 5- Interaction effect of nitrogen spraying × pinching on branch lenght of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)

پارامترهای زایشی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر قطر گل معنی‌دار نبوده ولی بر تعداد گل، وزن تر و وزن خشک گل در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۲).

تأثیر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر تعداد گل

تعداد گل در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد، به طوری که بیشترین تعداد گل (۷) در تیمار ۶ درصد نیتروژن به همراه

غنچه‌گیری و کمترین تعداد (۱) در تیمار صفر درصد نیتروژن بدون عمل غنچه‌گیری بدست آمد (شکل ۶). به طور کلی، غنچه‌گیری توام با محلول‌پاشی نیتروژن سبب تعداد شاخه بیشتر و تعداد گل بالاتر می‌شود. این افزایش در تعداد گل هر گیاه با غنچه‌گیری، هم‌چنین ممکن است به خاطر وجود انرژی بیشتر در تولید گل بیشتر باشد. این نتایج با گزارشات پراکاش و همکاران (۲۰) و سینگ و همکاران (۳۱) در گل جعفری رقم پوسا نارانگی گایندا و دالال و همکاران (۴) در میخک مطابقت دارد.

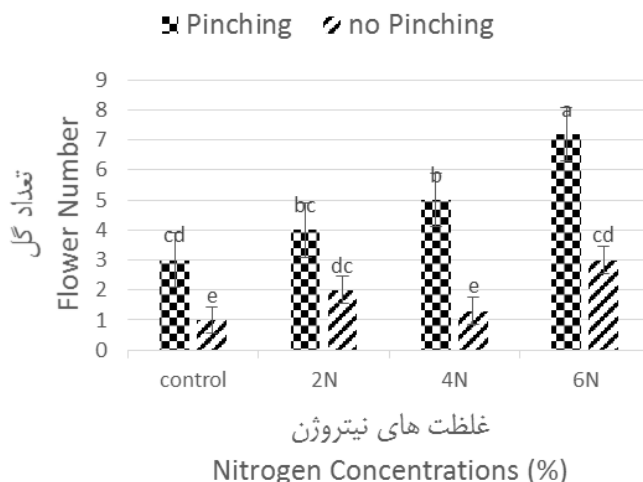
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر صفات زایشی گل جعفری

Table 2- ANOVA result of pinching and nitrogen spraying effect on reproductive traits of African marigold

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean square				
		قطر گل Flower diameter	تعداد گل Flower number	وزن تر گل Flower fresh weight	وزن خشک گل Flower dry weight	تعداد روز تا گلدهی Day number to flowering
تکرار Replication	2	1.11 ^{ns}	1.54 ^{ns}	0.005 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.80 ^{ns}
غنچه‌گیری Pinching	1	48.88 ^{**}	54.00 ^{**}	0.005 ^{ns}	0.01760 ^{**}	2340.40 ^{**}
درصد نیتروژن Nitrogen percent	3	12.90 ^{**}	9.89 ^{**}	0.3718 ^{**}	0.01986 ^{**}	331.90 ^{**}
غنچه‌گیری × درصد نیتروژن Pinching × Nitrogen percent	3	1.07 ^{ns}	2.78 ^{**}	0.7436 ^{**}	0.06032 ^{**}	182.40 ^{**}
خطا Error	14	0.330	0.450	0.005	0.001	0.600
ضریب تغییرات CV (%)	-	12.60	14.00	1.69	5.40	25.00

^{**} و ^{ns} و به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی‌داری

^{**}, and ^{ns}: significant at 1% of probability level and non-significant, respectively.



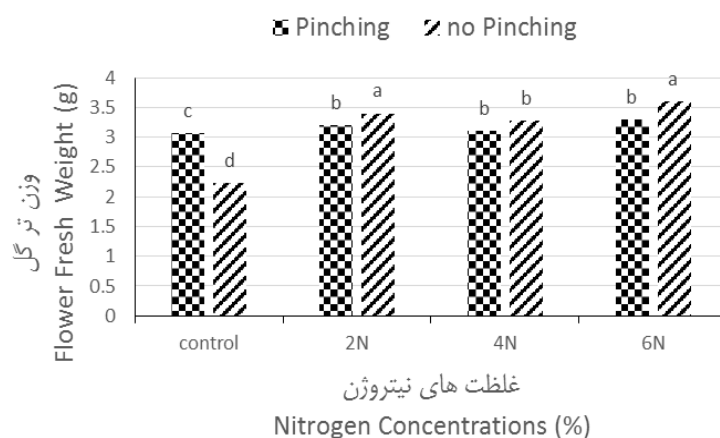
شکل ۶- اثر متقابل محلول‌پاشی نیتروژن × غنچه‌گیری بر تعداد گل جعفری

Figure 6- Interaction effect of nitrogen spraying and pinching on flower number of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)

افزایش قطر گل، وزن تر و وزن خشک گل شاید به دلیل فراهمی بیشتر مواد غذایی در اثر کاربرد نیتروژن و تخصیص انرژی به گل‌ها باشد. از آنجایی که حذف جوانه انتهایی منجر به تولید گل‌های بیشتر اما کوچک‌تر می‌گردد، بیشترین وزن تر و خشک گل در تیمارهای بدون غنچه‌گیری مشاهده شده است. نتایج مشابهی در گزارشات ساسیکومار و همکاران (۲۵) و راتور و همکاران (۲۲) در گل جعفری وجود دارد.

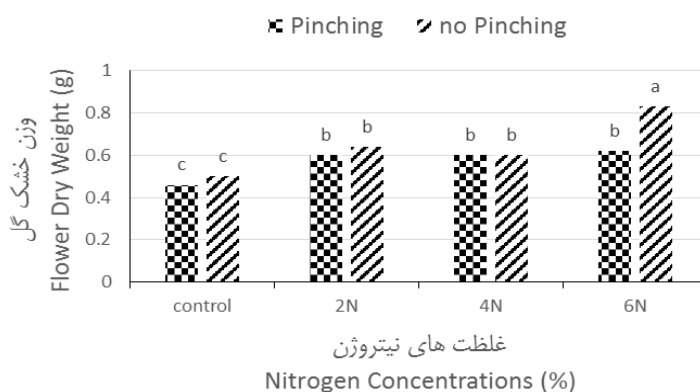
تأثیر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر وزن تر و وزن خشک گل

وزن تر و خشک گل در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. به طوری که بیشترین وزن تر (۳/۶۰ گرم) و وزن خشک گل (۰/۸ گرم) در تیمار ۶ درصد نیتروژن بدون عمل غنچه‌گیری و کمترین وزن تر (۲/۳۰ گرم) و وزن خشک گل (۰/۴ گرم) در تیمار ۰ درصد نیتروژن بدون عمل غنچه‌گیری ایجاد شد (شکل‌های ۷ و ۸). دلیل



شکل ۷- اثر متقابل محلول‌پاشی نیتروژن × غنچه‌گیری بر وزن تر گل جعفری

Figure 7- Interaction effect of nitrogen spraying and pinching on flower fresh weight of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)



شکل ۸- اثر متقابل محلول‌پاشی نیتروژن × غنچه‌گیری بر وزن خشک گل جعفری

Figure 8- Interaction effect of nitrogen spraying and pinching on flower dry weight of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)

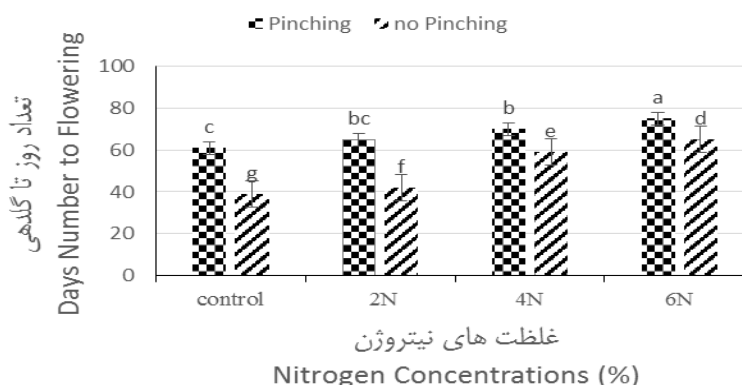
درصد معنی‌دار شده است (جدول ۳). تعداد روز تا گلدهی در بین تیمارها متفاوت بود و تیمارهای غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن هر دو تعداد روزهای شروع گلدهی را به تاخیر انداختند. تیمار ۶ درصد نیتروژن به همراه غنچه‌گیری نیاز به تعداد روز بالاتری (۷۵ روز) نسبت به دیگر تیمارها تا گلدهی داشت و این میزان در تیمار ۰ درصد

تأثیر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر تعداد روز تا گلدهی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غنچه‌گیری و محلول‌پاشی نیتروژن بر تعداد روز تا گلدهی در سطح ۱

فراهمی نیتروژن سبب افزایش رشد رویشی گیاه شده و نتیجه آن تاخیر در گلدهی و کوتاه شدن دوره گلدهی است. نتایج مشابهی توسط پارهی و همکاران (۱۸) در گل جعفری و دالال و همکاران (۴) در میخک گزارش شده است.

نیتروژن بدون عمل غنچه گیری، کمترین میزان (۳۸ روز) بود (شکل ۹). این امر شاید به دلیل حذف جوانه انتهایی باشد که با توقف تقسیم سلولی در مرستم جانبی، فرآیند آغازش جوانه را مانع گردیده و از توسعه پریمودیای گل در این ضمن جلوگیری می نماید. بعلاوه،



شکل ۹- اثر متقابل محلول پاشی نیتروژن × غنچه گیری بر تعداد روز تا گلدهی جعفری

Figure 9- Interaction effect of nitrogen spraying and pinching on days number to flowering of African marigold. (DMRT, $p \leq 0.01$)

افزایش تبدیل تربیپتوفان به ایندول استیک اسید و افزایش تقسیم و طولی شدن سلول باشد که منجر به افزایش فاصله میان گره ها می گردد. بیشترین قطر گیاه با محلول پاشی ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک و کمترین قطر گیاه در شاهد به دست آمد. بعلاوه، افزایش غلظت اسید جیبرلیک سبب افزایش قطر ساقه اصلی شد (جدول ۴). کومار و همکاران (۱۳) بیان نمودند که زمانی که ارتفاع گیاه افزایش می یابد، به همان نسبت نیز قطر افزایش می یابد. نتایج مشابهی در گزارشات سابل و همکاران (۲۳) آمده است.

تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر تعداد شاخه های

فرعی و تعداد برگ

مقایسه میانگین داده ها نشان داد که کاربرد تنظیم کننده های رشد گیاهی در سطوح مختلف، اثرات معنی داری بر تعداد شاخه و برگ جعفری داشتند. تعداد شاخه ها با افزایش غلظت اسید جیبرلیک در مقایسه با شاهد افزایش یافت، به طوری که بیشترین تعداد شاخه در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده گردید (جدول ۴). داباس و همکاران (۳) دریافتند که کاربرد برگی اسید جیبرلیک ممکن است بر طولی شدن ساقه به واسطه انگیزش تقسیم سلولی و طولی شدن سلول اثر گذاشته و سبب افزایش تعداد شاخه و رشد رویشی شود. تعداد برگ با افزایش غلظت اسید جیبرلیک افزایش یافت، به طوری که بیشترین تعداد برگ در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر ایجاد گردید (جدول ۴). ساجید و همکاران (۲۴) بیان نمودند که کاربرد برگی اسید جیبرلیک

نتایج آزمایش دوم

پارامترهای رشدی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر ارتفاع و قطر گیاه، تعداد برگ و تعداد شاخه در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شده است (جدول ۳).

تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر ارتفاع و قطر گیاه

مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن نشان داد که کاربرد هر دو تیمار اسید جیبرلیک و ایندول استیک اسید سبب افزایش معنی دار ارتفاع گیاه نسبت به شاهد شدند. بعلاوه، با افزایش غلظت در هر دو تیمار، ارتفاع افزایش یافت، به طوری که بالاترین ارتفاع گیاه (۳۴/۲۵ سانتی متر) با کاربرد اسید جیبرلیک با غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین ارتفاع گیاه (۲۳/۱۶ سانتی متر) در شاهد بدست آمد (جدول ۴). کومار و همکاران (۱۲) دریافتند که غلظت های بالاتر اسید جیبرلیک (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر)، بیشترین تأثیر را بر تقسیم سلول و طولی شدن بافت های جوان گیاهان جعفری داشتند، در حالی که غلظت های پایین تر (۵۰ میلی گرم بر لیتر)، نتایج قابل قبولی را ایجاد نکردند. اشمیت و همکاران (۲۶) گزارش نمودند که افزایش ارتفاع به میزان ۱۶/۷۸ درصد در گل های داوودی مشاهده گردید، زمانی که غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک استفاده شد. کوریش و همکاران (۱۰) بیان نمودند که اثر برانگیزاننده رشد توسط جیبرلین ها ممکن است به واسطه افزایش سطح اکسین بافت یا

سبب افزایش تقسیم و طویل شدن سلول و بنابراین تمایز یابی بافت‌ها می‌گردد. از طرفی، جیبرلین تعداد شاخه‌ها را نیز افزایش داده که به نوبه خود در افزایش تعداد برگ نیز موثر می‌باشد. کومار و همکاران (۱۳) گزارش نمودند که افزایش در تعداد برگ با کاربرد اسید جیبرلیک نتیجه القای آغازش برگ و تمایز یابی پریموردیای برگ‌گی در ناحیه رشد انتهایی است. سینگ و همکاران (۳۰) بیان نمودند که اسید جیبرلیک سبب افزایش تعداد برگ در گل همیشه بهار نیز شده است.

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر طول شاخه
مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت هر دو تنظیم‌کننده رشد، طول شاخه نیز افزایش یافت و بیشترین طول شاخه (۲۳ سانتی‌متر) در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک ایجاد شد و با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داد. کمترین طول شاخه (۲/۲۵ سانتی‌متر) در شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات رویشی گل جعفری

Table 3- ANOVA results of PGRs effect on vegetative traits of African marigold

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean square				
		ارتفاع Height	تعداد شاخه Branch number	تعداد برگ Leaf number	قطر ساقه Stem diameter	طول شاخه Branch lenght
تکرار Replication	2	3.64**	5.14**	0.10 ^{ns}	0.365*	5.58**
تیمار Treatment	6	42.70**	67.30**	407.40**	0.698**	143.31**
خطا Error	12	0.580	0.140	1.100	0.149	0.080
ضریب تغییرات CV (%)	-	12.10	37.00	9.50	31.00	21.00

** و ns به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی‌داری.

** and ns: significant at 1%, and non-significant, respectively.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات رویشی گل جعفری

Table 4- Mean comparison results of PGRs effect on vegetative traits of African marigold

تیمارها Treatments	ارتفاع Height	قطر ساقه Stem diameter	تعداد شاخه Branch number	تعداد برگ Leaf number	طول شاخه Branch lenght
شاهد Control	23.16e*	0.50c	2.00d	19.00d	2.25e
۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک 100 mgL ⁻¹ GA ₃	28.00d	0.66c	2.66c	20.00d	10.75c
۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک 200 mgL ⁻¹ GA ₃	31.83b	1.50ab	12.00b	39.66ab	17.00b
۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک 300 mgL ⁻¹ GA ₃	34.25a	1.70a	14.00a	41.50a	23.00a
۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید 50 mgL ⁻¹ IAA	29.66c	0.50c	3.00d	13.50e	7.50d
۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید 100 mgL ⁻¹ IAA	32.50b	0.75c	6.00c	23.50c	11.25c
۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید 150 mgL ⁻¹ IAA	32.73b	1.00c	7.50b	39.00b	17.16b

*وجود حروف مشترک بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در هر ستون است.

*Means followed by the same letters in each column are not significantly (DMRT, $p \leq 0.01$).

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تعداد و قطر گل

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در سطوح مختلف، اثر معنی‌داری بر تعداد و قطر گل در هر گیاه داشتند. حداکثر تعداد (۶) و قطر گل (۳ سانتی‌متر) در گیاهان تیمار

پارامترهای زایشی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر قطر و تعداد گل، وزن تر و وزن خشک گل و تعداد روز تا گلدهی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۵).

شده با اسید جیبرلیک در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین تعداد (۱) و قطر گل (۰/۶۳ سانتی متر) در شاهد و غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر ایندول استیک اسید به دست آمد (جدول ۶). افزایش در تعداد و قطر گل با کاربرد تیمارهای اسید جیبرلیک نتیجه افزایش ارتفاع گیاه و تعداد برگ در هر گیاه می باشد. افزایش تعداد برگ سبب افزایش در تولید و تجمع مواد فتوسنتزی شده و این مواد به سمت گل ها هدایت گردیده و سبب تولید تعداد و قطر گل بیشتر گردیده است. از نتایج ما این طور استنباط می شود که اسید جیبرلیک ممکن است مسئول فراهمی مواد غذایی در زمان گلدهی گیاهان باشد (جدول ۶). نتایج مشابهی توسط اسواروپ و همکاران (۳۲)، ساجید و همکاران (۲۴) و شریف الزمان و همکاران (۲۸) به دست آمده است.

تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر وزن تر و خشک گل

مقایسه میانگین داده ها نشان داد که کاربرد تنظیم کننده های رشد، اثر معنی داری بر وزن گل ایجاد نمودند. حداکثر وزن تر (۳/۱۳ گرم) و خشک گل (۰/۶۵ گرم) در گیاهان تیمار شده در غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین وزن تر (۲ گرم) و خشک گل (۰/۴۶ گرم) در شاهد و ۵۰ میلی گرم بر لیتر ایندول استیک اسید ایجاد گردید (جدول ۶). افزایش در وزن تر گل ممکن است به دلیل افزایش تعداد برگ ها و در نتیجه افزایش تولید مواد آسیمیلاته و تخصیص آن به گل ها باشد. کومار و همکاران (۱۴) گزارش نمودند که وزن تر گل های میخک با محلول پاشی غلظت های مختلف اسید جیبرلیک افزایش یافته است. هم چنین، سینگ (۲۹) دریافت که تیمار اسید جیبرلیک سبب افزایش وزن تر گل های همیشه بهار می گردد.

تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر تعداد روز تا گلدهی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که تأثیر تنظیم

کننده های رشد گیاهی بر تعداد روز تا گلدهی در سطح ۱ درصد معنی دار شده است. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تنظیم کننده های رشد در سطوح مختلف اثر معنی داری بر گلدهی و ظهور گل ها داشتند. سریع ترین گلدهی، ۳۱ روز بعد از کاشت با تیمار ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر ثبت شد، در حالی که در گیاهان شاهد، ۷۰ روز بعد از کاشت، گلدهی به طول انجامید (جدول ۶). تسریع در گلدهی و پدیدار شدن گل ها با محلول پاشی اسید جیبرلیک ممکن است به دلیل افزایش در سطوح جیبرلین داخلی در گیاهان باشد. پرموردیای گل توسط جیبرلین توسعه می یابد. نتایج مشابهی توسط کومار و همکاران (۱۲) به دست آمده است.

فنگچاچون و همکاران (۱۹) گزارش نمودند که اثر اسید جیبرلیک بر آغازش گل و تسریع گلدهی به واسطه کاهش در غلظت هورمون آبسازیک اسید در شاخه گیاهان بوده است. بعلاوه، ساجید و همکاران (۲۴) بیان نمودند که زمانی که تعداد برگ افزایش می یابد، مواد فتوسنتزی بیشتری برای تسریع در گلدهی فراهم می گردد. کومار و همکاران (۱۴) دریافتند که تمامی غلظت های اسید جیبرلیک سبب تسریع در گلدهی در میخک نسبت به شاهد شده است.

نتیجه گیری

از نتایج ما این گونه استنباط می شود که غنچه گیری به همراه کاربرد برگی ۶ درصد نیتروژن سبب افزایش تعداد شاخه و تعداد گل و کاربرد برگی ۶ درصد نیتروژن به تنهایی سبب افزایش قطر گل و وزن تر و خشک گل شدند. بعلاوه، کاربرد برگی اسید جیبرلیک رابطه مستقیمی با افزایش ارتفاع، تعداد شاخه و قطر گل و رابطه معکوسی با تعداد روز تا گلدهی نشان دادند. غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک، بیشترین تأثیر را بر خصوصیات رشدی و زایشی گل جعفری داشت.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر صفات زایشی گل جعفری

Table 5- ANOVA results of PGRs effect on reproductive traits of African marigold

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean square				
		قطر گل Flower diameter	تعداد گل Flower number	وزن تر گل Flower fresh weight	وزن خشک گل Flower dry weight	تعداد روز تا گلدهی Day number to flowering
تکرار Replication	2	0.48**	2.58**	0.3733**	0.0036**	7.00**
تیمار Treatment	6	2.66**	10.03**	0.4705**	0.014**	4.492**
خطا Error	12	0.057	0.240	0.123	0.0005	0.050
ضرب تغییرات CV (%)	-	23.00	32.00	20.40	3.20	20.06

** و ns به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی داری.

** and ns: significant at 1%, and non-significant, respectively.

جدول ۶- نتایج مقایسه میانگین اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر صفات زایشی گل جعفری
Table 6- Mean comparison results of PGRs effect on reproductive traits of African marigold

تیمارها Treatments	تعداد گل Flower number	قطر گل Flower diameter	وزن تر گل Flower fresh weight	وزن خشک گل Flower dry weight	تعداد روز تا گلدهی Day number to flowering
شاهد Control	1.00d*	0.63d	2.00c	0.46e	70.00a
۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک 100 mgL ⁻¹ GA ₃	2.00c	1.25c	2.30bc	0.49d	62.00d
۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک 200 mgL ⁻¹ GA ₃	4.00b	2.50b	2.50abc	0.52c	58.00e
۳۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید جیبرلیک 300 mgL ⁻¹ GA ₃	6.00a	3.00a	3.13a	0.65a	31.00f
۵۰ میلی گرم بر لیتر ایندول استیک اسید 50 mgL ⁻¹ IAA	1.00d	0.75d	2.10c	0.47e	65.00b
۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ایندول استیک اسید 100 mgL ⁻¹ IAA	2.72c	1.50c	2.40bc	0.53c	64.00c
۱۵۰ میلی گرم بر لیتر ایندول استیک اسید 150 mgL ⁻¹ IAA	4.00b	2.55b	2.80ab	0.59b	62.00d

* وجود حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در هر ستون است.

* Means followed by the same letters in each column are not significantly (DMRT, $p \leq 0.01$).

از آنجایی که گل جعفری در طراحی باغ و پارک کاربرد بسیاری دارد، بنابراین کاربرد برگی ۶ درصد نیتروژن و یا ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک به منظور بهبود صفات زایشی گل توصیه می‌گردد.

منابع

- 1- Badge S., Panchbhay D.M., and Gajbhiye R.P. 2015. Nutrient content, uptake and yield in African marigold (*Tagetes erecta* Linn) as influenced by pinching and foliar application of gibberellic acid. Indian Journal of Agricultural Research 49(6): 534-538.
- 2- Bora R.K., and Sarma C.M. 2006. Effect of gibberellic acid and cycocel on growth, yield and protein content of pea. Asian Journal of Plant Sciences 5: 324-330.
- 3- Dabas H.K., Mitra L., and Dabas. S. 2001. Effect of different concentrations of GA₃ MH and NAA on primary branches of marigold (*Tagetes erecta* L.). Journal of Indian Agriculture 45(3-4): 265-267.
- 4- Dalal S.R., Nandre D.R., Bharad S.G., Utgikar S., and Shinde R.D. 2006. Effect of pinching on carnation cv. Yellow Solar under polyhouse condition. International Journal of Agricultural Science 2(2): 356-357.
- 5- Dhaduk B.K., Kumara S., Singh A., and Desai J.R. 2007. Response of gibberellic acid on growth and flowering attributes in anthurium (*Anthurium andreanum* Lind.). Journal of Ornamental Horticulture 10(3): 187-189.
- 6- Dorajeero A.V.D., and Mokashi A.N. 2012. Growth analysis as influenced by pinching time in garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). The Global Journal of Biochemistry and Biotechnology 1(2): 242-247.
- 7- Gou J., Strauss S.H., Tsai C.J., Fang K., Chen Y., Jiang X., and Busov. V.B. 2010. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with Auxin and other hormones. The Plant Cell 22: 623-639.
- 8- Hussain K., Hussain M., Majeed A., Nawaz K., Nisar M.F., and Afghan. S. 2010. Morphological response of scurf pea (*Psoralea corylifolia* L.) to indole acetic acid (IAA) and nitrogen (N). World Applied Sciences Journal 8: 1220-1225.
- 9- Khudus S., Prasad V.M., and Jogdand S.M. 2017. Effect of Plant Growth Regulators on Growth and Flower Yield of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) cv. Bon Bon. Chemical Science Review Letter 6(22): 1290-1294.
- 10- Koriesh E.M., Dahab A.M.A., and Ali. E.W.M. 1989. Physiological studies on *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Effect of cycocel, gibberellic acid and nucleic acids on vegetative growth and some chemical components. Assiut Journal of Agricultural Science 20 (1): 27-41.

- 11- Kumar P., Raghava, S.P.S., Mishra R.L., and Singh. K.P. 2003. Effect of GA3 on growth and yield of China aster. *Journal of Ornamental Horticulture*, 6(2): 110-112.
- 12- Kumar R., Mohan R., and Gaur. G.S. 2010. Effect of GA3 and Ethrel on growth and flowering of African marigold cv. Pusa Narangi Gaiinda. *Indian Journal of Horticulture* 67: 362-366.
- 13- Kumar A., Kumar J., Mohan B.J.P., Singh J., Rajbeer P., and Ram. N. 2011. Effect of plant growth regulators on growth, flowering and yield of African marigold (*Tagetes erecta* L.) cv. Pusa Narangi Gaiinda. *The Asian Journal of Horticulture*.
- 14- Kumar V., Kumar V., Umrao V., and Singh. M. 2012. Effect of GA3 and IAA on growth and flowering of carnation. *HortFlora Research Spectrum* 1(1): 69-72.
- 15- Kumar H., Kumar J., Dev P., Ram N., and Kaviraj J. 2016. Effect of Nitrogen and GA3 on growth and flowering behavior of African marigold (*Tagetes erecta* L.) cv. Pusa Narangi Gaiinda. *International Journal of Agricultural Invention* 1(1): 84 – 87.
- 16- Maharnor S.I., Chopde N., Thakre S., and Raut, P.D. 2011. Effect of nitrogen and pinching on growth and yield of African marigold. *Asian Journal of Horticulture*: 6(1): 43-45.
- 17- Meena Y., Sirohi H.S., Tomar S.B., and Kumar S. 2015. Effect of planting time, spacing and pinching on growth and seed yield of African marigold cv. Pusa Narangi Gaiinda. *Indian Journal of Agricultural Science*, 85(6): 797-801.
- 18- Parhi R., Mohanti A., and Harichandan S. 2016. Performance of various characters in African marigold due to different in pinching levels and planting dates. *Annals of Agri-Bio Research* 21(1): 44-48.
- 19- Phengphachanh B., Naphrom D., Bundithya W., and Potapohn. N. 2012. Effects of Day-length and Gibberellic Acid (GA3) on Flowering and Endogenous Hormone Levels in *Rhynchosytilis gigantea* (Lindl.) Ridl. *Journal of Agricultural Science* 4(4): 217-222.
- 20- Prakash S., Anitha P., Giridharan M.P., Rajgopalan A., and Rao S.V.G. 2016. Impact of seasons and pinching on growth and flowering in African marigold. *Journal of Tropical Agriculture* 54(1): 50-54.
- 21- Pushkar N.C., and Singh A. K. 2012. Effect of pinching and growth retardants on flowering and yield of African marigold (*Tagetes erecta* L.) var. Pusa Narangi Gaiinda. *International Journal of Horticulture* 2:1-4.
- 22- Rathore I., Mishra A., Moond S.K., and Bhatnagar P. 2011. Studies on effect of pinching and plant bio regulators on growth and flowering of marigold (*Tagetes erecta* L.). *Progressive Horticulture* 43(1): 52-55.
- 23- Sable P.B., Ransingh U.R., and Waskar D.P. 2015. Effect of Foliar Application of Plant Growth Regulators on Growth and Flower Quality of Gladiolus Cv. 'H.B.Pitt'. *Journal of Horticulture* 2: 141.
- 24- Sajid M., Amin, N., Ahmad H., and Khan. K. 2016. Effect of gibberellic acid on enhancing flowering time in *Chrysanthemum morifolium*. *Pakistan Journal of Botany* 48(2): 477-483.
- 25- Sasikumar K., Baskaran V., and Abirami K. 2015. Effect of pinching and growth retardants on growth and flowering in African marigold cv. Pusa Narangi Gaiinda. *Journal of Horticultural Science* 10(1): 109-111.
- 26- Schmidt C., Bellé A.B., Nardi C., Toledo A.K. 2003. The gibberellic acid) GA3) in the cut chrysanthemum (*Dedranthema grandiflora* Tzevelev.) viking: planting summer/autumn. *Revista Ciência Rural* 33(2): 1451-1455 .
- 27- Sehrawat S.K., Dahiya D.S., Singh S., and Rana, G.S. 2003. Effect of nitrogen and pinching on growth, flowering and yield of marigold (*Tagetes erecta* L.) Cv. African Giant Double Orange. *Haryana Journal of Horticultural Science* 32(1, 2): 59-61.
- 28- Sharifuzzaman S.M., Ara K.A., Rahman M.H., Kabir K., and Talukdar M.B. 2011. Effect of GA3, CCC and MH on vegetative growth, flower yield and quality of chrysanthemum. *International Journal of Experimental Agriculture* 2(1): 17-20.
- 29- Singh K. 2003. Effect of growth regulators and shoot tip pinching on calendula. *Journal of Ornamental Horticulture* 6(2): 134-136.
- 30- Singh A.K. 2003b. Effect of growth regulators on growth and flowering in calendula (*Calendula officinalis*). *Indian Perfumer* 47(3): 275-278.
- 31- Singh V., Singh A.k., and Sisodia A. 2017. Growth and flowering of marigold as influenced by pinching and spraying of nitrogen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(7): 2283- 2287.
- 32- Swaroop K., Singh K.P., and Raju D.V.S. 2007. Vegetative growth, flowering and seed characters of African marigold (*Tagetes erecta* L.) as in fluenced by different growth substances during mild off seasons. *Journal of Ornamental Horticulture* 10(4): 268-270.
- 33- Vwioko E.D., and Longe M.U. 2009. Auxin and gibberellin effects on growth and fruit size in *Lagenaria siceraria* (*Molina standley*). *Bioscience Research Communications* 21: 263-271.



Effect of Pinching, Spraying of Nitrogen and Plant Growth Regulators on Vegetative and Reproductive Characteristics of African Marigold

M. Zamanipour^{1*}

Received: 25-02-2019

Accepted: 06-07-2019

Introduction: African marigold is one of the most popular annual flowers in almost of countries. In the most ornamental plants, the flowering and yield depends on the flowering branches that can be increased with pinching. Nitrogen spraying is beneficial on the growth, production and quality improvement of marigold flowers. Among plant growth regulators, auxin and gibberellin play a crucial role in regulating the development processes of African marigold.

Material and Methods: This study was carried out in the research greenhouse of Velayat University of Iranshahr in two separate experiments in December 2017. The beds were prepared after mixing the soil with FYM (Farm Yard Manure) and the seeds of African marigold var. "African Double Orange" were sown on the bed at a distance of 10 cm between the row and 2 to 3 cm within the row. Transplanting of plantlets were performed in the 3 to 4 leaves stages in distances of 45 cm×35 cm. Treatments of the first experiment were contains of two stages of pinching (no pinching and pinching in 20 days after planting) and nitrogen spraying in four stages (0%, 2%, 4% and 6%). A factorial experiment was laid out in a complete randomized block design with three replications where each replication was comprised of six plantlets. Treatments of the second experiment consisted of three levels of indole acetic acid (50, 100 and 150 mgL⁻¹) and three levels of gibberellic acid (100, 200 and 300 mgL⁻¹) and distilled water as control. The first stage of auxin and gibberellin spraying, 20 days after planting and the second stage of spraying, was performed 50 days after planting.

On the harvest time (when the last flower harvested), measurement factors were contains of vegetative parameters (plant height and diameter, branch number, leaf number and branch length) and reproductive parameters (flower number, flower diameter, flower fresh weight and flower dry weight). Days taken to flowering were counted from transplanting till the date of flower bud opening.

Result and Discussion: Analysis of variance showed that pinching and nitrogen spraying had significant effects on plant height and diameter, branch number, leaf number and branch length per plant ($P < 0.01$). The highest plant height (47.5 cm), plant diameter (2.5 cm) and branch length per plant (21.5 cm) obtained in no pinching with 6% N treatment. This result showed that spraying of nitrogen could increase apical dominance and growth of longitudinal growth of plant. The maximum leaf number (91) and branch number (10) obtained in pinching 20 days after harvesting with 6% N treatment. When the apical dominance is removed, the lowering of IAA (Indol acetic acid) concentration increased the new branches. Increasing in new branches and positive effect of nitrogen spraying created new leaves. Analysis of variance showed that pinching and nitrogen spraying were not effective on flower diameter but had significant effects on flower number, flower fresh weight and flower dry weight. The highest flower number (7) were created in pinching supplemented with 6% N treatment. The highest flower fresh weight (3.60 g) and flower dry weight (0.8 g) were obtained in no pinching and 6% N treatment. Sing et al. (2017) reported that no pinching increased availability of more food material and better allocation of energy pertaining to less number of flowers. Therefore, this action increased the fresh and dry weight of flower. Analysis of variance showed that pinching and nitrogen spraying had significant effects on the number of days to bud flower initiation. The highest number of days to flowering (75 day) were obtained in pinching supplemented with 6% N treatment. Pinching of apical bud prevents from cell division in the lateral meristem. Nitrogen spraying also increased vegetative growth of plant and therefore, resulted in delaying the initiation of flower bud. The quality of seedlings significantly increased with gibberellic acid spraying compared to indole acetic acid. As the concentration increased, seedling quality increased, so that the highest plant height (34.25 cm), the length of each branch (23 cm), Leaf number (42), the number of branches (14), flower diameter (3 cm), dry weight of flower (0.65 g), fresh weight of flower (3.13 g), flower number (6) and the minimum number of days to flowering (31 days) were sprayed with gibberellic acid at a concentration of 300 mgL⁻¹.

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Faculty of Technical and Engineering, Velayat University, Iranshahr, Iran

(* - Corresponding Author Email: m. zamanipour@velayat.ac.ir)

Increasing the number of flowers by application of gibberellic acid treatments resulted from an increasing in plant height and the number of leaves per plant. Increasing the number of leaves increased the production and accumulation of photosynthetic assimilates, and these assimilates were directed to the flowers and resulted in the production of more flowers.

Conclusion: Pinching and Spraying of nitrogen had significant effects on the vegetative and reproductive traits of African marigold. Pinching reduced the apical dominance and induced more lateral branches that ultimately increased the flower number of marigold., Nitrogen spraying was also effective on the growth and quality improvement of marigold flowers and the highest number of flower and fresh and dry weight of flowers induced with application of 6% N. In addition, the application of spraying of gibberellic acid had a direct correlation with height, the number of branches and the diameter of flowers and inversed relationship with the number of days to flowering. The concentration of 300 mgL⁻¹ gibberellic acid had the greatest effect on the growth and reproductive characteristics of African marigold. Since, the African marigold is widely used in the garden and park landscapes, the application of 6% nitrogen or 300 mgL⁻¹ of gibberellic acid is recommended to improve the reproductive characteristics of the flower.

Keywords: IAA, GA₃, Plantlet quality, Urea



نقش اکوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کشت تعلیقی سلولی چویل (*Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss.)

سید مهران علوی^۱ - اسد معصومی اصل^{۲*} - ناصر زارع^۳ - رسول اصغری زکریا^۴ - پریسا شیخ زاده مصدق^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵

چکیده

گیاه چویل دارای خواص داروئی مختلف بوده و تاکنون گزارشی از کشت تعلیقی سلولی این گیاه بومی ایران ارائه نشده است. به منظور ارزیابی تأثیر عوامل مختلف بر پینه‌زایی چویل، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتورها شامل اکوتیپ (آب‌نهر، گایونه، وزگ و سی‌سخت)، ریزنمونه (ریشه، برگ و ساقه) به همراه ترکیبات هورمونی مختلف NAA و BAP (هر کدام در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک بودند. نتایج نشان دادند که بهترین اکوتیپ در واکنش به پینه‌زایی، اکوتیپ آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگ و بهترین ترکیب هورمونی شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. به منظور بررسی تأثیر عوامل مختلف بر کشت تعلیقی سلولی چویل، علاوه بر هورمون NAA، از سطوح مختلف (غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هورمون 2,4-D نیز در ترکیب با هورمون BAP استفاده شد. بهترین ترکیب هورمونی برای کشت تعلیق سلولی، ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA یا 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود و بهترین ریزنمونه و اکوتیپ به ترتیب، ریزنمونه برگ و اکوتیپ آب‌نهر بود. در مجموع، اکوتیپ آب‌نهر و ریزنمونه برگ هم در کشت پینه و هم در کشت تعلیقی سلولی نسبت به بقیه اکوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها برتری نشان دادند و بهترین ترکیب هورمونی در هر دو نوع کشت ۱-۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

واژه‌های کلیدی: پینه، تنظیم‌کننده رشد، ژنوتیپ، SCV، PCV

مقدمه

بودن، در موسم بهار در اکثر خانه‌های روستایی دسته‌هایی از ساقه‌های این گیاه یافت می‌شود. از گل‌های باز شده و برگ‌های جوان گیاه نیز برای خوش‌بو و خوش‌طعم کردن انواع غذاها همچون دوغ، ماست و کره استفاده می‌شود (۱).

اسانس و شیرابه بسیار معطر ساقه و برگ گیاه چویل دارای خاصیت ضدعفونی‌کنندگی بوده و در پزشکی استفاده می‌شود. این گیاه اثر مسکن و تقویت‌کنندگی داشته و در درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای استفاده می‌شود (۱ و ۳۳). نتایج مطالعات بر روی چویل نشان داد که اسانس گیاه از فعالیت ضد میکروبی بالایی برخوردار است (۴). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی اسانس حاصل از بذر و سرشاخه‌های هوایی چویل صورت گرفت، مشخص شد که اسانس آن دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشد (۴۱).

عوامل متعددی در موفقیت کشت بافت گیاهان داروئی دخیل می‌باشند طوری که نمی‌توان یک رویکرد را برای تمام گونه‌ها توصیه نمود. یکی از مهم‌ترین عوامل، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف و برهمکنش آنها با یکدیگر است (۲۷). مشخص شده است که وجود

گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata* متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. جنس *Ferulago* دارای حدود ۳۵ گونه در سراسر دنیا می‌باشد که تعداد ۷ گونه از آن در ایران رویش دارد (۲۵). گیاه چویل معمولاً در نقاط مرطوب و نیمه مرطوب به صورت خودرو رویش دارد اما رویشگاه اصلی چویل در ایران، منطقه زاگرس می‌باشد. این گیاه کم و بیش در استان‌های مرکزی، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کرمانشاه، همدان، کرمان و نیز در قسمت‌هایی از سلسله کوه‌های البرز وجود دارد (۱). زمان گلدهی، از اواخر اردیبهشت تا اواسط خرداد ماه ادامه دارد، زمان رسیدگی بذر از اواخر شهریور تا اوایل مهرماه می‌باشد. به دلیل معطر

۱، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران و استادیار گروه اصلاح نباتات،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

(*)- نویسنده مسئول: (Email: Masoumiasl@yu.ac.ir)

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.79173

BAP جهت تشکیل پینه مؤثرتر بود (۴۲). فولادوند و همکاران ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP را جهت تولید تعداد زیاد سلول معرفی نمودند (۱۰). سیتوکینین‌ها به‌طور مستقیم روی چرخه سلولی اثر گذاشته و در تنظیم تولید پروتئین‌های دخیل در تشکیل و عملکرد رشته‌های دوک نقش دارند. اکسین‌ها نیز از طریق افزایش انبساط‌پذیری دیواره سلول و تحریک رونویسی mRNAهای رمزکننده پروتئین‌های درگیر با رشد سلول، در چرخه سلولی تأثیر می‌گذارند (۳۳).

تاکنون مطالعات بسیار اندکی درخصوص کشت درون شیشه‌ای گیاه چویل صورت گرفته است. طی یک مطالعه بر روی گیاه چویل مشخص شد بهترین محیط کشت جهت کشت رویان چویل و تولید پینه، محیط ۱/۴MS می‌باشد (۲۴)، همچنین طی تحقیقاتی که بر روی گیاه باریجه انجام شده محیط کشت ۱/۴MS بهترین محیط برای رشد تشخیص داده شد (۳۵). این روند نیز در گیاه وشاء (*Dorma ammoniacum*) گزارش گردید (۱۱). در یک آزمایش به‌منظور تولید جنین‌رویشی از پینه گیاه چویل، از هورمون‌های NAA و BAP استفاده شد، نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های ریشه‌چه و ساقچه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP تشکیل پینه دادند (۳۷). در مورد بهینه‌سازی پینه‌زایی و کشت تعلیقی سلولی آن با هدف بهبود تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه گزارشی موجود نیست. لذا این مطالعه جهت تعیین مطلوب‌ترین شرایط برای تولید پینه و کشت تعلیق سلولی در گیاه داروئی چویل طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور چویل (*Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss.) شهریور ماه سال ۱۳۹۴ از ارتفاعات چهار رویشگاه مختلف در استان کهگیلویه و بویراحمد (آبنهر، گایونه، وزگ و سی‌سخت) همراه با ثبت مختصات جغرافیایی با استفاده از دستگاه GPS جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

مقادیر کم اکسین در محیط کشت یک مانع عمده در راه تکثیر ساقه می‌باشد (۳۲). واکنش به کشت بافت تحت تأثیر ترکیبات هورمونی و نوع ژنوتیپ گونه‌های گیاهی است (۲۹). از آنجا که ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، میزان متفاوتی پینه تشکیل می‌دهند، بنابراین انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشمگیری بر تولید پینه و رشد آن دارد (۱۷). جهت مطالعه الگوهای رشدی و تولید مواد گیاهی از جمله متابولیت‌های ثانویه، کشت پینه در مقایسه با کشت تعلیق سلولی، به دلیل محدودیت‌هایی که از نظر یکنواختی تولید سلول و نیز دسترسی یکنواخت تک تک سلول‌ها به اکسیژن و مواد غذایی دارد، از قابلیت کمتری برخوردار است (۲۱).

کشت تعلیقی سلولی، تعلیقی از سلول‌های در حال رشد و تقسیم سریع می‌باشد که در محیط مایع کشت و در پاسخ به دستورزی‌های آزمایشگاهی از انعطاف‌پذیری بیشتری برخوردارند. کشت تعلیقی مطلوب که به‌طور کامل از سلول‌های منفرد تشکیل شده باشد، به ندرت حاصل می‌شود، بیشتر تعلیق‌های سلولی، از مخلوطی از توده‌های سلولی و نیز سلول‌های منفرد پراکنده تشکیل شده‌اند. با این وجود از طریق چندین نسل گزینش می‌توان یک کشت تعلیق سلولی متشکل از تک سلول‌ها و توده‌های سلولی کوچک را ایجاد و نگهداری کرد (۸). در کشت سلولی، رشد و ریخت‌زایی به وسیله نوع و غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و برهمکنش آنها کنترل می‌شود (۳۰).

مشخص شده که 2,4-D به عنوان قویترین اکسین می‌باشد و اکسین‌ها با غلظت بالا سبب افزایش رشد طولی و افزایش تقسیم می‌شوند (۳۶). اغلب مطالعات نشان می‌دهد به‌طور معمول 2,4-D برای تولید پینه و تمایززدایی مؤثرتر می‌باشند و از میان سیتوکینین‌ها، BAP در تولید پینه کارایی بیشتری دارد (۵). در گیاه دارویی آنفوزه به‌منظور تولید پینه از ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون حاصل از گیاهچه به‌دست آمده از کشت بافت، آزمایشی انجام شد و نتایج نشان داد که فراوانی القاء پینه در ریزنمونه ریشه به‌میزان قابل توجهی بیشتر از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون می‌باشد، همچنین از بین تیمارها به کار رفته، هورمون NAA در ترکیب با

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی اکوتیپ‌های چویل جمع‌آوری شده

Table 1- Geographic coordination of collected *Ferulago angulata* ecotypes

طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	رویشگاه
Longitude	Latitude	Altitude (m)	Habitat (Ecotype)
51° 41' 42"	30° 40' 49"	2843	آبنهر Abenahr
51° 40' 18"	30° 43' 56"	3053	گایونه Gaouneh
51° 41' 37"	30° 30' 8"	2677	وزگ Vezg
51° 33' 37"	30° 50' 1"	2861	سی‌سخت Sisakht

در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت انجام واکشت، هر ۱۴ روز یکبار سوسپانسیون سلولی با محیط کشت مایع تازه به نسبت ۱ به ۲ رقیق گردید. علاوه بر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP از سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نیز در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP به منظور استقرار تعلیق سلولی استفاده شد.

شاخص‌های مورد مطالعه

به منظور بررسی میزان رشد سلول‌ها در کشت تعلیق و ترسیم منحنی رشد سلول‌ها، از دو شاخص حجم سلول متراکم شده (PCV^1) و شاخص حجم سلول ساکن (SCV^2) استفاده شد. برای تعیین شاخص PCV هر سه روز یکبار، ۱۰ میلی‌لیتر از تعلیق سلولی به فالکون دارای درجه‌بندی منتقل شد و با سرعت ۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار PCV از طریق اندازه‌گیری درصد سلول‌های رسوب یافته نسبت به حجم کل سانتریفیوژ شده محاسبه شد. برای تعیین شاخص SCV نیز هر سه روز یکبار، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول‌ها و توده‌های سلولی در فالکون درجه‌بندی ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حالت سکون نگهداری شد تا سلول‌ها و توده‌های سلولی رسوب کنند. در نهایت، حجم سلول یادداشت گردید و به صورت درصد از کل محیط برداشت شده محاسبه گردید.

واکوی آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. اکوتیپ (چهار سطح)، ریزنمونه (سه سطح) هورمون‌های NAA و BAP (هرکدام در چهار سطح) به عنوان فاکتورهای آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم گردید. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش پینه‌زایی

با توجه به اینکه بذور اکوتیپ‌های مختلف از ارتفاعات صعب‌عبوری جمع‌آوری شده بود که از لحاظ ارتفاع و شرایط جوی با هم تفاوت‌هایی دارند و به صورت طبیعی نیز زمان رویش این گیاه در این مناطق بسته به ذوب شدن برف‌ها و رسیدن به دمای بهینه، از اواسط اسفند تا اواسط اردیبهشت متغیر می‌بود.

با توجه به اینکه بذور در زمان رسیدگی از گیاه مادری برداشت شده بود، به منظور خشک شدن و از بین رفتن رطوبت احتمالی، بذرها به مدت یک تا دو روز در هوای معمولی و زیر نور آفتاب قرار گرفتند. ابتدا بذور با استفاده از آب و مایع ظرف‌شویی شسته شدند و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و بذور ضدعفونی شده به مدت ۱ تا ۲ روز قبل از کشت، درون آب مقطر گرفتند تا پوسته بذر متورم و نرم شود. در زمان کشت نیز زیر هود لامینار ایرفلو ضدعفونی مجدد بذور با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه انجام و سپس شستشو با آب دوبار تقطیر استریل انجام شد و به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲٪ غوطه‌ور شدند و سپس بذور سه مرتبه با آب دوبار تقطیر شستشو داده شدند و آب اضافی آنها توسط کاغذ صافی استریل گرفته شد و اقدام به استخراج جنین و کشت جنین بر روی محیط کشت شد تا گیاهچه استریل به منظور تهیه ریزنمونه بدست آید. ظروف کشت به اتاقک رشد با دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت MS (۲۶) با غلظت یک چهارم نمک بود (۲۳). برای تهیه ریزنمونه، از گیاهچه‌های استریل حاصل از کشت جنین استفاده شد. از اندام‌های برگ، ریشه و ساقه ریزنمونه‌های مختلف به ابعاد ۵ میلی‌متر تهیه شد و روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP کشت شد. پس از دو هفته، نمونه‌های فاقد آلودگی متورم شده و آثار تشکیل پینه در آنها مشاهده گردید. میزان پینه‌زایی به صورت درصد پینه‌زایی بر اساس تولید و یا عدم تولید پینه در ریزنمونه‌ها یادداشت برداری گردید. در طی دوره رشد، پینه‌ها با توجه به علائم نکروزه شدن به علت پخش مواد زائد گیاه از جمله فنل در محیط کشت و یا توقف رشد، هر ۲ هفته یکبار واکشت می‌شدند. ۵ هفته بعد از کشت، صفات وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه و حجم پینه اندازه‌گیری و نوع پینه و رنگ آن یادداشت‌برداری شدند. صفت کیفی بافت پینه بر اساس سفت و نرم بودن پینه و صفت رنگ پینه هم بر اساس رنگ‌های سبز، زرد، شیری و سفید ارزیابی شدند.

استقرار کشت تعلیق سلولی

بهترین اکوتیپ از نظر پینه‌دهی انتخاب و به محیط کشت تعلیق منتقل شدند. برای تهیه محیط کشت تعلیقی سلولی از محیط کشت استقرار پینه (پینه‌زایی)، بدون افزودن آگار استفاده شد و از قطعات پینه تولید شده برای انتقال به محیط مایع و تشکیل تعلیق سلولی استفاده شد. بدین منظور بهترین محیط کشت و بهترین ترکیب هورمونی به همراه بهترین ریزنمونه از هر اکوتیپ با پینه‌دهی مناسب مشخص و پس از تیمار با اسکالپل به نحو ملایم به محیط کشت مایع انتقال داده شد و در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و

1- Packed Cell Volume (PCV)

2- Settled Cell Volume (SCV)

جدول ۲- کدهای مربوط به تیمارها

Table 2- Treatment codes

Treatment code		کد تیمار			
اکوتیپ Ecotype (A)		A1: Abnahr آب نه‌ر	A2: Gauoneh گایونه	A3: Sisakht سی سخت	A4: vezg وزگ
Plant Growth Regulator تنظیم کننده رشد گیاهی	BAP (B)	B1: 0 mg ^l -1	B2: 0.5 mg ^l -1	B3: 1 mg ^l -1	B4: 2 mg ^l -1
	NAA (C)	C1: 0 mg ^l -1	C2: 0.5 mg ^l -1	C3: 1 mg ^l -1	C4: 2 mg ^l -1
Explant (D) نمونه		D1: Leaf برگ	D2: Stem ساقه	D3: Root ریشه	

نتایج نشان داد اولین ریزنمونه‌ای که شروع به پینه‌دهی نمود، مربوط به ریزنمونه ریشه اکوتیپ آب‌نه‌ر بود که تقریباً یک هفته بعد از قرار گرفتن در محیط کشت، شروع به پینه‌دهی نمود و سایر اکوتیپ‌ها بعد از ۱۰ تا ۱۵ روز شروع به پینه‌دهی نمودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی اکوتیپ، ریزنمونه و نوع تنظیم-

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات ارزیابی شده در مرحله پینه‌زایی گیاه چویل

Table 3- ANOVA (mean squares) of evaluated traits in callogenesis step of Chavil

منابع تغییرات Source of Variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of Squares			
		حجم پینه Callus volume	پینه‌زایی Callogenesis	طول پینه Callus length	وزن خشک پینه Callus dry weight
اکوتیپ Ecotype	3	1.648**	21265.432**	56.277**	10.158**
BAP	3	0.793**	35117.798**	382.220**	94.511**
NAA	3	0.925**	39224.803**	395.873**	56.213**
ریزنمونه Explant	2	0.400**	3403.096**	44.753**	25.650**
اکوتیپ×BAP	9	0.049**	389.074**	2.742**	0.688**
BAP×Ecotype					
Ecotype×NAA	9	0.51**	145.184**	2.939**	0.308**
NAA×اکوتیپ					
اکوتیپ×ریزنمونه	6	0.243**	2839.644**	27.790**	9.368**
Ecotype × Explant					
NAA×BAP	9	0.026**	848.031**	8.507**	0.861**
ریزنمونه×BAP	6	0.044**	516.017**	2.343**	1.55**
BAP×Explant					
ریزنمونه×NAA	6	0.023**	326.501**	3.580**	0.634**
NAA ×Explant					
BAP×NAA×اکوتیپ	27	0.022**	440.149**	0.327*	0.127
BAP×NAA×Explant					
ریزنمونه×BAP×اکوتیپ	18	0.049**	446.467**	1.775**	0.649**
Ecotype×BAP×Explant					
ریزنمونه×NAA×اکوتیپ	18	0.019**	397.352**	2.605**	0.492**
Ecotype×NAA×Explant					
ریزنمونه×BAP×NAA	18	0.025**	330.919**	0.520**	0.127
BAP×NAA×Explant					
ریزنمونه×BAP×NAA×اکوتیپ	54	0.026**	256.877**	0.643**	0.104
Ecotype×BAP×NAA×Explant					
Error اشتباه آزمایشی	384	0.009	47.238	0.200	0.108

جدول ۴- مقایسه میانگین وزن خشک پینه در مرحله پینه‌زایی گیاه چویل تحت تاثیر تیمارهای مورد بررسی

Table 4- Mean comparison for Callus dry weight in callogenesis step of Chavil

تیمار	وزن خشک پینه	تیمار	وزن خشک پینه	تیمار	وزن خشک پینه
Treatment	Callus dry weight (g)	Treatment	Callus dry weight (g)	Treatment	Callus dry weight (g)
A1C3D1	2.36 ^{e-i}	B1C1	2.25 ^d	A2B1D3	2.52 ^{b-e}
A2C1D2	2.29 ^{e-j}	B1C2	2.36 ^{dc}	A2B2D1	2.54 ^{b-e}
A2C2D2	2.46 ^{e-h}	B1C3	2.68 ^{ba}	A2B2D2	2.55 ^{b-e}
A2C3D1	2.56 ^{e-f}	B1C4	1.12 ^{fe}	A2B3D1	2.5 ^{e-d}
A2C3D2	2.51 ^{e-g}	B2C1	2.38 ^{dc}	A2B3D2	2.82 ^b
A2C3D3	2.59 ^{ed}	B2C2	2.53 ^{bc}	A2B3D3	2.38 ^{c-f}
A3C1D1	2.5 ^{e-g}	B2C3	2.86 ^a	A3B1D1	2.66 ^{cb}
A3C2D1	2.57 ^{e-f}	B2C4	1.19 ^e	A3B2D1	2.67 ^{cb}
A3C3D1	2.58 ^{ed}	B3C1	2.57 ^{bc}	A3B3D1	2.67 ^{cb}
A4C1D1	2.75 ^{dc}	B3C2	2.6 ^{abc}	A4B1D1	2.61 ^{b-d}
A4C1D2	2.92 ^{bc}	B3C3	2.76 ^{ba}	A4B1D2	3.1 ^a
A4C2D1	2.88 ^{bc}	B3C4	1.28 ^e	A4B2D1	3.36 ^a
A4C2D2	2.98 ^{bac}	B4C1	0.75 ^g	A4B2D2	3.13 ^a
A4C3D1	3.21 ^a	B4C2	0.78 ^g	A4B3D1	3.38 ^a
A4C3D2	3.07 ^{ba}	B4C3	0.89 ^{fg}	A4B3D2	3.17 ^a

بر اساس صفات درصد پینه‌زایی، بهترین اکوتیپ، آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگ می‌باشد اما در مورد هورمون NAA، بهترین سطح هورمون ۲ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین سطح هورمون BAP، ۲ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که باعث انجام صد در صد پینه‌زایی می‌شوند. بر اساس صفت حجم پینه، بهترین اکوتیپ، آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگ می‌باشد اما در مورد هورمون NAA، بهترین سطح هورمون ۱ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین سطح هورمون BAP، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که بیشترین حجم پینه را تولید کرده است. بر اساس صفت طول پینه، بهترین اکوتیپ، آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگ می‌باشد اما در مورد هورمون NAA، بهترین سطح هورمون ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین سطح هورمون BAP، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که بیشترین طول پینه را تولید کرده است (جدول ۵). می‌توان چنین اظهار نظر نمود که برای صفات مختلف اکوتیپ آب‌نهر نسبت به سایر اکوتیپ‌ها وضعیت مطلوب‌تری داشت، نیز ریزنمونه برگ از سایر ریز نمونه‌ها بهتر بود. اما در مورد هورمون‌ها، برهمکنش چهارگانه با اثرات اصلی تفاوت دارد.

پینه‌های تولیدی در اکوتیپ‌های مختلف از نظر تدری و رنگ تفاوت‌های زیادی داشتند حتی در ریزنمونه‌های بدست آمده از یک اکوتیپ، ترد و سفت بودن پینه‌ها و رنگ آنها با هم تفاوت داشت و از اینرو روند خاصی از جهت رنگ و یا تردی و سفتی در یک اکوتیپ و یا ریزنمونه وجود نداشت. به طور کلی رنگ پینه‌ها از شیرینی رنگ تا قهوه‌ای و تردی پینه‌ها نیز از شل آبکی تا سفت متغیر بود (شکل ۱).

برای صفت وزن خشک پینه برهمکنش چهارگانه معنی‌دار نشد لذا مقایسه میانگین‌ها برای این صفت، برای برهمکنش‌های سه گانه اکوتیپ*NAA*ریزنمونه و اکوتیپ*BAP*ریزنمونه که معنی‌دار شده بودند، انجام گرفت. برای مقایسات میانگین برهمکنش سه گانه، با توجه به کثرت و تعداد سطوح هر تیمار، بهترین برهمکنش‌های سه گانه برای صفت وزن خشک پینه ارزیابی شد. برهمکنش دوگانه BAP*NAA نیز برای صفت وزن خشک مورد بررسی قرار گرفت. مقایسات میانگین نشان داد بهترین سطح ریزنمونه، اکوتیپ و هورمون NAA، با ریزنمونه ریشه در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA برای اکوتیپ وزگ با میانگین ۳/۲۱ بدست آمد. برای برهمکنش اکوتیپ*BAP*ریزنمونه، نیز بالاترین میانگین وزن خشک پینه متعلق به اکوتیپ وزگ برای ریزنمونه ریشه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP با میانگین ۳/۳۸ بود. با این تفاسیر می‌توان گفت که اکوتیپ وزگ دارای بیشترین میانگین وزن خشک پینه می‌باشد که در اثرات اصلی برای این صفت نیز این روند مشاهده شده بود. مقایسه میانگین‌ها مشخص نمود برای برهمکنش سه گانه، بهترین ریزنمونه و اکوتیپ، ریزنمونه‌های ریشه از اکوتیپ وزگ می‌باشد. برهمکنش دوگانه BAP*NAA برای صفت وزن خشک پینه نشان داد که بالاترین وزن خشک پینه با میانگین ۲/۸۶ متعلق به ترکیب سطوح هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود.

برای مقایسات میانگین برهمکنش چهارگانه، با توجه به کثرت و تعداد سطوح هر تیمار، بهترین برهمکنش‌های چهارگانه برای صفات ارزیابی شده در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- مقایسه میانگین بهترین برهمکنش‌های چهارگانه پینه‌زایی، حجم پینه و طول پینه در گیاه چویل

Table 5- Mean comparison of the best quadratic interactions for callogenesis, callus volume and callus length in Chavil

تیمار	طول پینه	تیمار	حجم پینه	تیمار	پینه‌زایی
Treatment	Callus length (cm)	Treatment	Callus volume (mm ³)	Treatment	Callogenesis (%)
A1B2C2D2	8.20 ^a	A1B2C3D2	1.30 ^a	A1B2C2D2	96 ^{ab}
A1B2C3D2	7.76 ^{ab}	A1B1C2D3	0.33 ^{g-m}	A1B2C3D1	91.67 ^{a-c}
A1B3C2D2	6.93 ^{b-l}	A1B1C3D3	0.37 ^{f-n}	A1B2C3D2	100 ^a
A1B3C3D2	7.70 ^{abc}	A1B1C4D3	0.42 ^{e-k}	A1B2C3D3	96 ^{ab}
A1B3C4D2	7.16 ^{b-i}	A1B2C2D1	0.52 ^{def}	A1B2C4D1	91.67 ^{a-c}
A1B4C3D2	7.53 ^{a-e}	A1B2C2D2	0.56 ^{cde}	A1B2C4D2	100 ^a
A1B4C4D2	7.20 ^{b-i}	A1B2C3D1	0.40 ^{e-m}	A1B2C4D3	100 ^a
A2B2C3D2	7.13 ^{b-j}	A1B2C4D1	0.43 ^{e-k}	A1B3C2D1	100 ^a
A2B2C4D2	6.83 ^{d-m}	A1B2C4D2	0.70 ^{bc}	A1B3C2D2	100 ^a
A2B3C3D2	7.00 ^{b-k}	A1B3C1D2	0.46 ^{e-j}	A1B3C2D3	91.67 ^{a-c}
A2B3C4D2	7.60 ^{a-d}	A1B3C2D1	0.32 ^{h-p}	A1B3C3D1	91.67 ^{a-c}
A2B4C4D2	6.67 ^{d-n}	A1B3C2D2	0.66 ^{cbd}	A1B3C3D2	100 ^a
A3B2C2D3	7.62 ^{a-d}	A1B3C3D1	0.31 ^{h-q}	A1B3C3D3	100 ^a
A3B2C3D3	7.51 ^{a-f}	A1B3C4D1	0.34 ^{g-n}	A1B3C4D1	100 ^a
A3B2C4D3	7.66 ^{abc}	A1B3C4D2	0.57 ^{de}	A1B3C4D3	96 ^{ab}
A3B3C2D3	7.24 ^{b-h}	A1B4C1D2	0.47 ^{e-i}	A1B4C2D2	100 ^a
A3B3C3D3	7.62 ^{a-d}	A1B4C2D2	0.41 ^{e-l}	A1B4C2D3	100 ^a
A3B3C4D2	6.67 ^{d-n}	A1B4C3D1	0.30 ^{i-r}	A1B4C3D2	100 ^a
A3B3C4D3	7.66 ^{abc}	A1B4C3D2	0.51 ^{d-g}	A1B4C4D1	100 ^a
A3B4C2D3	7.40 ^{a-g}	A1B4C4D1	0.50 ^{d-h}	A1B4C4D2	100 ^a
A3B4C3D3	7.66 ^{abc}	A1B4C4D2	0.70 ^{bc}	A2B3C4D3	92 ^{abc}
A3B4C4D2	6.76 ^{d-n}	A3B3C3D2	0.30 ^{i-r}	A3B3C4D2	92 ^{abc}
A3B4C4D3	7.65 ^{abc}	A3B4C4D2	0.33 ^{g-m}	A3B4C4D2	100 ^a



شکل ۱- پینه‌های تولیدی از ریزنمونه‌های برگ اکوتیپ آب‌نهر گیاه چویل در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

Figure 1- Produced callus types from leaf explants of Abenahr's *Ferulago angulata* ecotype in MS medium containing 2 mg l⁻¹ NAA plus 0.5 mg l⁻¹ BAP

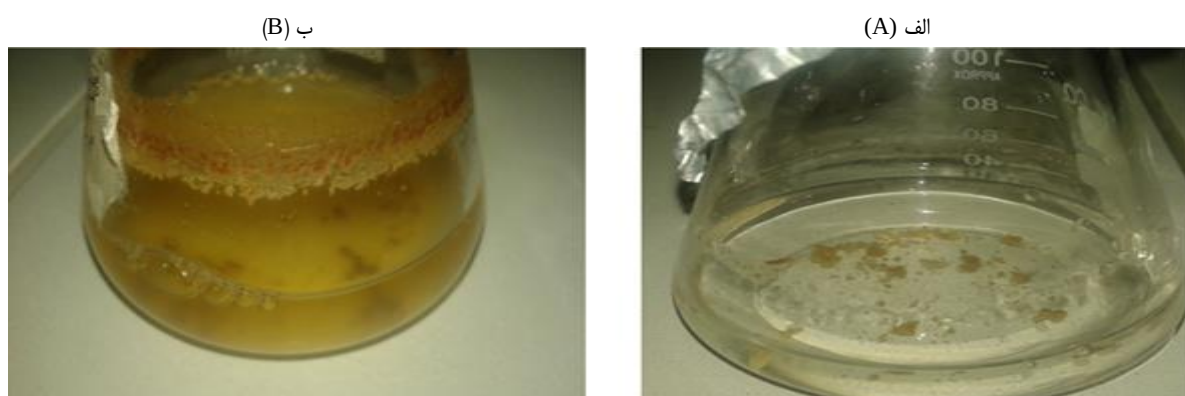
لحاظ ظاهری نسبت به بقیه پینه‌ها در وضعیت مطلوب‌تری قرار داشتند، استفاده شد. بدین ترتیب پینه‌ها از اکوتیپ‌ها و ریزنمونه‌هایی

نتایج و بحث آزمایش تعلیق سلولی
به منظور دستیابی به کشت تعلیقی سلولی، از پینه‌هایی که از

پینه از ریزنمونه‌های مختلف موثر واقع شد. عوامل مؤثر بر رشد و نمو در کشت درون شیشه‌ای، شامل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد (۲).

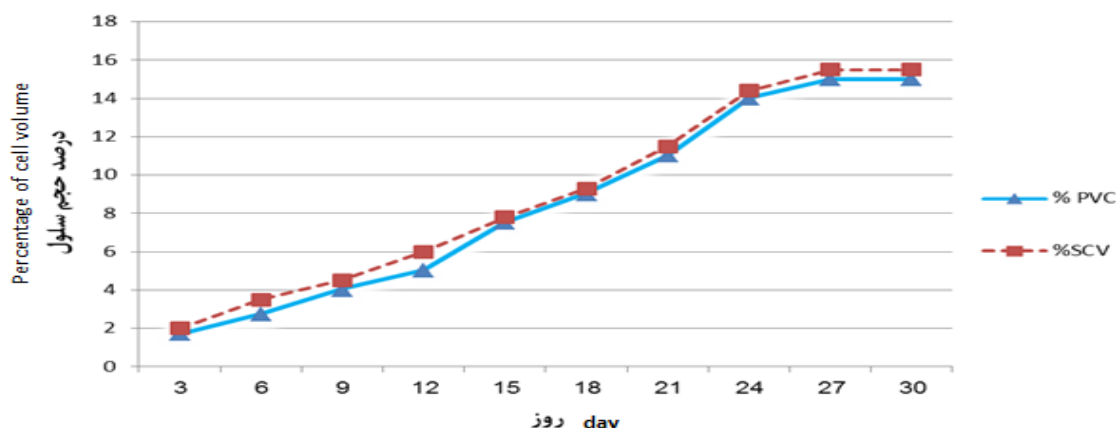
شکل ۳ بیانگر روند رشد سلولی در کشت تعلیقی سلولی حاصل از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر است. این نمودار بر اساس شاخص‌های PCV و SCV ترسیم شده است. از روش‌های ارزیابی رشد در کشت‌های تعلیق سلول گیاهی، محاسبه مقادیر SCV و PCV می‌باشد (۳۹). نتایج نشان داد پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ‌های PCV و SCV قویتری نسبت به پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه می‌باشند. سایر اکوتیپ‌ها در مقایسه با اکوتیپ آب‌نهر وضعیت مطلوبی نداشتند و این قضیه نیز از لحاظ ظاهری قابل مشاهده بود. PCV و SCV اندازه‌گیری شده در سایر اکوتیپ‌ها نیز این موضوع را تایید نمود به طوری غلظت تعلیق در آنها برای مدت زیادی بدون تغییر باقی ماند. نشان داده شده که در کشت تعلیق موز نیز به مرور زمان مقدار PCV افزایش یافت (۱۶). در مطالعه‌ای که بر روی *Taxus x media* Rehd. انجام شد مشخص گردید که PCV به عنوان روشی قابل اطمینان و سریع برای اندازه‌گیری رشد سلول به جای وزن خشک و تر سلول می‌باشد (۱۳). در کشت تعلیقی سلولی خشخاش ایرانی PCV و SCV همبستگی بسیار بالای با تراکم سلولی نشان داده است (۸). وقتی سلول‌های جدید در محیط تعلیق تشکیل می‌شوند، به صورت پراکنده یا توده در می‌آیند. این سلول‌ها سرعت تقسیم سلولی بیشتری نسبت به سلول‌های پینه نشان می‌دهند و به این دلیل تعلیقی سلولی در شرایطی که تقسیم سلولی سریع و نسل‌های سلولی پر جمعیت مورد نیاز باشد، کاربرد دارد (۳۱).

انتخاب شدند که تفاوت معنی‌داری نسبت به بقیه داشتند. از پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سایر اکوتیپ‌ها نیز استفاده گردید و علاوه بر محیط کشت‌هایی که از لحاظ هورمونی بهترین محیط کشت معرفی شد، به منظور اطمینان بیشتر از سایر نسبت‌های هورمونی به کار رفته در آزمایشات پینه‌زایی نیز استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده بهترین محیط کشت تعلیق سلولی، محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP بوده که پینه بدست آمده از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر در آن بکار رفته بود (شکل ۲). غلظت هورمونی مناسب برای هورمون NAA قابل پیش‌بینی بود زیرا اثرات اصلی این هورمون در سطح ۲ میلی گرم نسبت به سایر سطوح تفاوت معنی‌داری داشت. ولی در مورد هورمون BAP قضاوت کمی سخت‌تر بود، چون اثر اصلی این هورمون فقط به بود و نبود آن بستگی داشت و سطوح مختلف آن با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. بنابراین، این هورمون در حضور NAA تعیین‌کننده است و برهمکنش آن با هورمون NAA نشان دهنده تأثیر مثبت بر صفات ارزیابی شده بود. غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت برای پینه‌زایی بسیار مهم است. اکسین با غلظت متوسط تا زیاد، اولین هورمون مورد استفاده برای تولید پینه است. در بعضی گونه‌ها غلظت زیاد اکسین و غلظت کم سیتوکینین در محیط کشت، روند تولید پینه را بهبود می‌دهند (۹). هورمون NAA به تنهایی یا در ترکیب با هورمون BAP در القای پینه از ریزنمونه‌های ساقه و دمبرگ در دو محیط کشت MS و B5 بر روی گیاه *Salvia canariensis* L. بسیار موثر بود (۲۲). در مطالعه حاضر نیز محیط کشت MS حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BAP در القای



شکل ۲- رشد سلول‌های چویل در کشت تعلیقی سلولی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP. الف) توده‌های سلولی کشت تعلیق، ب) تغییر رنگ محیط کشت بر اثر افزایش تراکم سلولی

Figure 2- Growth of *Ferulago angulata* cells in cell suspension culture in MS medium containing 2 mg l^{-1} NAA and 0.5 mg l^{-1} BAP. A) Cell clumps suspensions, B) Color change in the culture medium due to increased cell density

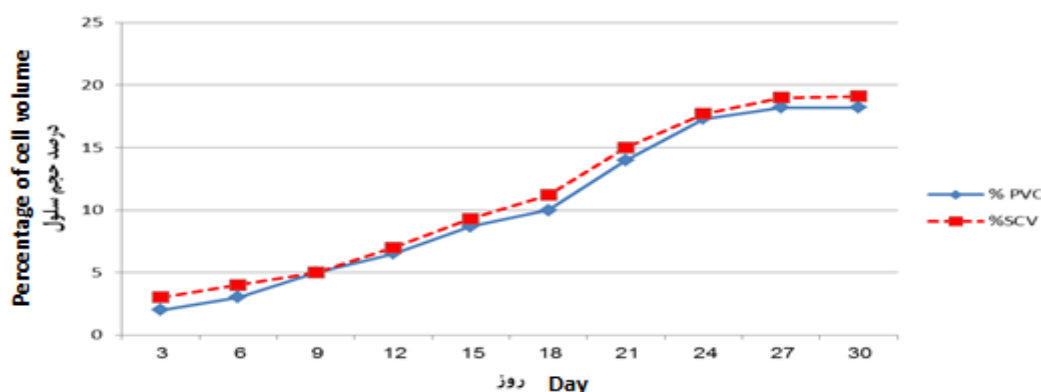


شکل ۳- منحنی رشد تعلیق سلولی گیاه چویل از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP

Figure 3- Growth curve of *Ferulago angulata* cell suspension from leaf explant of Abenahr ecotype in MS medium containing 2 mg l⁻¹ NAA and 0.5 mg l⁻¹ BAP

مدت زمان کمتر ایجاد شد که این روند نیز در کارهای تحقیقاتی مزیت محسوب می‌شود. با این حال استفاده از NAA هیچ‌گونه کاستی در روند موجود ایجاد ننمود. نکته حایز اهمیت این بود که نگهداری تعلیق تیمار شده با 2,4-D کمی سخت‌تر از تعلیق تیمار شده با NAA بود زیرا سلول‌های تعلیقی سریعتر وارد فاز لایتیک می‌شدند که این نوعی نقص جهت استفاده بلند مدت بود. معمولاً برای افزایش شکندگی و تردی پینه و ایجاد یک تعلیق خوب، از نسبت بالای اکسین به سیتوکینین استفاده می‌شود (۴).

با توجه به اینکه در کشت تعلیقی سلولی ورود به مرحله تعلیق کمی وقت گیر بود. جستجوی راهی که سریعتر تعلیق تشکیل گردد، اجتناب ناپذیر بود. لذا در کنار هورمون‌های ذکر شده اقدام به استفاده از هورمون 2,4-D در ترکیب با هورمون BAP به منظور تشکیل تعلیق شد. نتایج نیز نشان داد 2,4-D در سطح ۲ میلی گرم بر لیتر و BAP در سطح ۰/۵ میلی گرم بر لیتر به منظور تولید تعلیق مفید واقع شده‌اند (شکل ۴)، اما تفاوتی که با هورمون NAA در ترکیب با هورمون BAP داشت این بود که با اندازه گیری PCV و SCV حجم سلولی بیشتری مشاهده گردید و تعلیق سلولی با سرعت بیشتر و در



شکل ۴- منحنی رشد تعلیق سلولی گیاه چویل از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر هورمون 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP

Figure 4- Growth curve of *Ferulago angulata* cell suspension from leaf explant of Abenahr ecotype in MS medium containing 2 mg l⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg l⁻¹ BAP

NAA، رشد سلول تا ۳ هفته پس از اعمال تیمار افزایش و پس از آن

در کشت تعلیق *Cyperus aromaticus* با اعمال سطوح مختلف

مشخص شد که کاربرد هر دو تنظیم‌کننده رشد مذکور در القای پینه مؤثر هستند. همچنین مشخص شد که درصد پینه‌زایی در ریزنمونه‌های برگ بیشتر از ریزنمونه‌های قطعات گره است (۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های تحقیق می‌توان گفت اکسین‌ها جهت پینه‌زایی و تعلیق سلولی در گیاه چویل مهم می‌باشند. در این مطالعه مشاهده گردید هورمون NAA در حضور مقادیر کم از هورمون BAP باعث پینه‌زایی می‌شود و با افزایش غلظت اکسین NAA به ۲ میلی‌گرم در لیتر پینه‌زایی افزایش یافته است. همچنین مشخص گردید برای کشت تعلیقی سلولی دو هورمون NAA و 2,4-D در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه غلظت کم از هورمون BAP می‌تواند مفید واقع شود. لزوم وجود تنظیم‌کننده‌های اکسینی برای شروع پینه‌زایی در سایر گونه‌های علفی نیز مشاهده شده است (۱۴ و ۴۰). سیتوکینین‌ها به مقدار ناچیز برای پینه‌زایی و تولید کالوس مؤثر می‌باشند همان‌طور که در بسیاری گونه‌های دیگر استفاده از مقادیر اندک سیتوکینین توصیه شده است (۱۹ و ۲۸) در این تحقیق مشخص گردید که اکوتیپ‌های مختلف و حتی ریزنمونه‌های مختلف از یک اکوتیپ، از نظر واکنش به پینه‌زایی و تعلیق سلولی با هم تفاوت دارند و این تفاوت ممکن است ناشی از عوامل ژنتیکی یا عوامل محیطی گیاه مادری که بذرها از آنها گرفته شده بود باشند چون شرایط آزمایشگاهی برای همه اکوتیپ‌های مورد مطالعه یکسان بود. در این مطالعه ریزنمونه برگ‌ی از اکوتیپ آبنهر به عنوان بهترین ریزنمونه و بهترین اکوتیپ از نظر واکنش به پینه‌زایی و تعلیق سلولی بود.

کاهش یافت. با اعمال 2,4-D نیز رشد سلول تا هفته سوم افزایش یافت و پس از هفته سوم، رشد سلول کاهش نشان داد که این کاهش در مقایسه با هورمون NAA بسیار کم بود (۳). با توجه به نتایج، نوع ریزنمونه می‌تواند قدرت پینه‌زایی و تولید تعلیق را تحت تأثیر قرار دهد. در گیاه چغندر قند پینه‌زایی با استفاده از 2,4-D بسیار مؤثرتر از NAA در همه ریزنمونه‌های مورد استفاده بوده و همچنین مقادیر کم سیتوکینین‌ها در محیط حاوی اکسین تأثیر مطلوبی بر پینه‌زایی داشته است (۱۲). در تحقیق حاضر نیز 2,4-D برای تشکیل تعلیق مؤثرتر از NAA عمل کرد.

طی تحقیقی، با استفاده از برگ‌های جوان *Gymnema sylvestre* در محیط MS حاوی ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D پینه‌زایی و سپس کشت تعلیقی سلولی انجام شد (۲۰). کشت تعلیقی سلولی با انتقال پینه‌های نرم حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل بابونه آلمانی به محیط کشت MS مایع حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین استقرار یافت. منحنی رشد سلولی بابونه آلمانی نشان داد که تکثیر سلول‌ها از روز چهارم به بعد شروع شده و تا روز سیزدهم ادامه می‌یابد. سپس رشد سلولی متوقف شده و کشت‌ها وارد مرحله ایستایی می‌شوند (۱۸). در مطالعه‌ای بر روی *Pinus taeda* L. گزارش شده که مقدار SCV تا روز بیستم بدون واکنش افزایش یافته و بعد ثابت باقی ماند که به دلیل توقف رشد در کشت سلول‌ها بود (۳۸). در شرایط مناسب، سلول‌های پینه در محیط تعلیق می‌توانند به رشد دایم و بدون تغییر خود به طور نامحدود و با سرعت بیشتری نسبت به سلول‌های پینه ادامه دهند (۲۵ و ۳۴). قطعات گره و برگ گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) به عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS تیمار شده با غلظت‌های مختلف 2,4-D و NAA در ترکیب با ۲/۲۲ میکرومولار BAP از لحاظ میزان پینه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت و

منابع

- 1-Abraze M. 2004. Investigation of some ecological characteristics of Chavil (*Ferulago angulata*) in protected Dena area. Ms.C thesis in Natural resources, Tarbiat Modarres University, Tehran. (In Persian)
- 2-Bhojwani S.S., and Razdan M.K. 1992. Plant tissue culture, Theory and practice. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo.
- 3-Daud Z., and Keng C.L. 2006. Effects of plant growth regulators on the biomass of embryogenic cells of *Cyperus aromaticus* (Ridly) Mattf and Kukenth. *Biotechnology* 5:75-78.
- 4-Darderafshi M.J., Bahrami G.h., Sadeghi E., Khanahmadi M., Mohammadi M., and Mohammadi R. 2014. The effect of *Ferulago angulata* essential oil on *Staphylococcus aureus* during the manufacture and preservation of Iranian white cheese. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology* 8(4):13-20. (In Persian with English abstract)
- 5-Dixon R.A., and Gonzales R.A. 1996. Plant Cell Culture: A Practical Approach. 2nd Ed. IRL Press.
- 6-Ehsanpour A.A., and Amini F. 2003. Plant Cell and Tissue Culture. Jahad-Daneshgahi-Esfahan Publisher. (In Persian)
- 7-Evans D.E., Coleman J.O.D., and Kearns A. 2003. Plant cell culture: The basics. London, Taylor & Francis Publisher.
- 8-Farjaminezhad R., Zare N., Asghari-Zakaria R., and Farjaminezhad M. 2014. Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum* a biotechnology approach for thebaine production. *Turkish*

- Journal of Biology 37:689-697.
- 9-Farsi A.R., and Zulali J. 2014. Principles of plant biotechnology. Six Edition. Mashhad Ferdousi University Press. Iran. (In Persian)
- 10-Foladvand Z., Fazelinasab B., darikvand R., and Gasmi-pirbaloti A. 2014. Optimization of Callus Induction and Cell Suspension in *Catharanthus roseus*. Journal of Herbal Drugs, 5(3):157-163. (In Persian)
- 11-Ghasemian K.h., Nazeri S., Chehregani-Rad A., and Mirzaie-Asl A. 2012. The stages of somatic embryogenesis derived from zygotic embryo of *Dorema ammoniacum* D. Journal of Cell & Tissue (JCT) 3(1): 21-27. (In Persian with English abstract)
- 12-Gurel S., Gurel E., and Kaya Z. 2001. Callus development and indirect shoot regeneration from seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. Turkish Journal of Botany 25: 25-33.
- 13-Hren M., Baebler S., Camloh M., Kovac M., Ravnarik M., and Zel J. 2006. Yew (*Taxus x media* Rehd.) cell suspension cultures as a source of taxanes. Acta Physiologica Plantarum 28: 3-8.
- 14-Hussain Z., Haroon M., Bano R., Rashid H., and Chaudhry Z. 2010. Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. Pakistan Journal of Botany, 42:879-887.
- 15-Janarthanam B., Gopalakrishnan M., Lakshmi Sai G., and Sekar T. 2009. Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Tissue Culture and Biotechnology 19(2): 133-141.
- 16-Khalil S.M., and Elbanna A.A.M. 2003. Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). Arab Journal of Biotechnology 7: 99-110.
- 17-Khawar K.M., Sarihan E.O., Sevimay C.S., Cocu S., Parmaksiz I., Uranbey S., Ipek A., Kaya M.D., Sancak C., and Özcan S. 2005. Adventitious shoot regeneration and Micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Periodicum Biologorum 107:57-61.
- 18-Koohi L., Zare N., Asgari-zakaria R., Sheikhzadeh-Mosaddeg P., and Daryani P. 2013. The role of plant growth regulators and different explants on the tissue culture response and cell suspension in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Journal of Crop Ecophysiology 2 (30): 203-214. (In Persian with English abstract)
- 19-Kwon T.H., Abe T., and Sasahara T. 1993. Efficient callus induction and plant regeneration in *Sesamum* species. Plant Tissue and Culture Letters 10: 260-266.
- 20-Lee E., Mobin M., Hahn E.J., and Paek K.Y. 2006. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. Journal of Plant Biology 49: 427-431.
- 21-Lukmanul Hakkim F., Kalyani S., Essaa M., Girija S., and Song H. 2011. Production of rosmarinic acid in *Ocimum sanctum* (L.) cell suspension cultures by the influence of growth regulators. International Journal of Biological and Medical Research 2(4): 1158-1161.
- 22-Molina S.M. 2004. *In vitro* callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. Plant and Tissue Culture 14: 167-172.
- 23-Mortazavi R., Dehdari M., and Masoumiasl A. 2016. Study of Callus Induction of Medicinal Chavil Plant (*Ferulago angulata* B.) Using Types of Explants and Growth Regulators. Agricultural Biotechnology 14(2): 73-80. (In Persian with English abstract)
- 24-Mozaffarian V. 2007. Iranian Plant Culture Names. First Volume, First edition, Farhang-e- Moaser Publisher. Tehran, Iran. (In Persian)
- 25-Mujib A., Bandhyopadhyay S., and Ghosh P.D. 2000. Tissue culture derived plantlet variation in *Caladium* an important ornamental. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 149-155.
- 26-Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum 15: 473-497.
- 27-Mythili J.B., and Thomas P. 1999. Micropropagation of Pointed Gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). Scientia Horticulture 79: 87-90.
- 28-Ozgen M., Turet M., Altinok S., and Sancak C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Reports 18: 331-335.
- 29-Palai S.K., Rout G.R., and Das P. 1997. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.): interaction of growth regulators and culture conditions. Proceeding of Biotechnology of Spices, Medicinal and Aromatic Plants, Kerala, 20-24.
- 30-Perez-Bermudez P., Cornejo M.J., and Segura J. 1983. *In vitro* propagation of *Digitalis obscura* L. Plant Science Letters 30: 77-82.
- 31-Phillips G.C., Hubstenberger J.F., and Hansen E.E. 1995. Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Heidelberg: Springer and Verlag, 67-78.
- 32-Ramirez-Malagon R., Borodanenco A., Barrera-Guerra J.L., and Ochoa-Alejo N. 2001. Shoot number and shoot size as affected by growth regulators in *in vitro* Cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. Scientia Horticulture 89: 227-236.
- 33-Richard D., Lescot M., Inze D., and De Veylder L. 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene

- expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 167-176.
- 34-Senoussi M.M., Nora B., and Joe C. 2009. Impact of hypoxia on the growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension. Acta Physiologiae Plantarum 31: 359-362.
35. Sarabadani-tafreshi R., Omid M., Bihamta M.R., and Davazdahemami S. 2008. Study of in vitro embryo culture and Effect of explants, different hormonal levels on callus induction and shooting of *Ferula gummosa*. Journal of Medicinal Plants 27: 71-81. (In Persian)
- 36-Shahadati-Moghadam Z. 2001. Plant growth regulators. M.Sc. Thesis of agriculture, Mazandaran University, Iran. (In Persian)
- 37-Sorbi E., Moradi a., Masoumiasl A., and Balochi H.R. 2017. Optimization of Callus Induction and somatic embryogenesis in two Genotypes of medicinal Chavil plant (*Ferulago angulata* L.). Plant Production Research 21(3): 41-62. (In Persian)
- 38-Silveira V., Floh E.I.S., Handro W., and Pedro Guerra M. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 53-60.
- 39-Street H.E. 1977. Plant tissue and cell culture. 2nd Edition, Blackwell. Oxford.
- 40-Taha H.S., El-Bahr M.K., and Seif-El-Nasr M.M. 2008. *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: 1- calli Production, direct shootlets Regeneration and alkaloids determination. Journal of Applied Science Research 4: 1017-1022.
- 41-Taran M., Ghasempour H.R., and Shirinpour E. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. Carduchorum. Jundishapur Journal of Microbiology 3: 10-4. (In Persian)
- 42-Zare A., Solouki R., Omid M., Irvani M., Mahdi-Nezad N., and Rezazadeh S.H. 2010. Callus induction and plant regeneration in *Ferula assa-foetida* L. (Asafetida), an endangered medicinal plant. Trakia Journal of Sciences 8(1): 11-18.



The Role of Ecotype, Explant and Plant Growth Regulators on Cell Suspension Culture of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss.

S.M. Alavi¹- A. Masoumiasl^{2*}- N. Zare³- R. Asghari Zakaria⁴- P. Sheikhzade Mosaddegh⁵

Received: 02-03-2019

Accepted: 27-08-2019

Introduction: The main habitat of Chavil, *Ferulago angulata*, in Iran is Zagros area. This plant has a rejuvenating effect and is used to treat digestive diseases and intestinal worms. Because the different explants show different amounts of callogenesis under the effect of different growth regulators, selection of an optimal explant and suitable plant growth regulators combination has a significant effect on the production of callus and their suspension culture. There is no reports on *Ferulago angulata* callogenesis and its cell suspension culture. Therefore, this study was designed and implemented to optimize callus production and cell suspension culture in this important medicinal plant.

Materials and Methods: Seeds of Chavil were collected from four different habitats in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province in Southwest of Iran include Abenahr, Guayoune, Vezg and Sisakhat. Seedlings obtained from embryo culture were used to prepare the explants. Various explants (leaf, root and stem) were cultured on MS medium supplemented with different concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg l⁻¹) of NAA and BAP. Callus traits were evaluated and from the best culture medium, the best explants and the best PGRs composition for callogenesis of each ecotype were used to cell suspension culture. In order to study the growth rate of cells in suspension culture and plotting the curve of cells growth, two cell density indices and packed cell volume index were evaluated. To determine the cell density index, every 3 days, 10 ml of cell suspension were transferred to the graded falcon and centrifuged at 5000 g for 5 minutes, and the percentage of sediment cells was calculated as the total volume. To determine the packed cell volume index, also every 3 days, 10 ml of culture medium containing cells were transferred to the graded falcon and stored for 30 minutes to precipitate cells and cell masses. Finally, the cell volume was recorded and was calculated as percentage of the total collected medium.

Results and Discussion: According to the callogenesis percentage, the best ecotype is Abenahr and best explant is leaf explant. The highest level of NAA is 2 mg l⁻¹, and the best level of BAP is 2 mg l⁻¹, which causes 100 callogenesis percentage. The best medium for cell suspension culture is MS medium containing 2 mg l⁻¹ NAA and 0.5 mg l⁻¹ BAP for callus was obtained from leaf explant of Abenahr ecotype. Along with these plant growth regulators, 2,4-D was used in combination with BAP to form suspension culture. The results also showed that 2 mg l⁻¹ 2,4-D plus 0.5 mg l⁻¹ BAP were useful in producing suspensions. The difference between 2,4-D + BAP and NAA + BAP combinations more cell volumes were observed, and cell suspension was created at a faster rate and in less time, which is an advantage in research work. Growth rate of cell suspension originated from the leaf explant was higher than root explant. In terms of culturing cell suspension, the Abenahr ecotype was favorable compared to other ecotypes. During cell suppression culture of *Cyperus aromaticus* by applying different levels of NAA, cell growth was increased up to 3 weeks after application, and then decreased. By applying 2,4-D, cell growth also increased until the third week, and after the third week, cell growth declined, which was very low growth rate compared with the NAA. In cell suspension culture of sugar beet, using 2,4-D was much more effective than NAA on all explants. In the present study, 2,4-D was also more effective than NAA for cell suspension culture of Chavil.

Conclusion: In general, the Abenahr was the best ecotype among of investigated. The explants in both callus culture and the suspension culture, and the best combination of plant growth regulator in both culture was 2 mg l⁻¹ NAA plus 0.5 mg l⁻¹ BAP.

Keywords: Callus, Genotype, PCV, Plant growth regulator, SCV

1, 3, 4 and 5- Ph.D. Student, Associate Professors and Assistant Professor of Department of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, respectively.

2- Associate Professor of Department of Agriculture, Yasouj University

(*- Corresponding Author Email: Masoumiasl@yu.ac.ir)



اثر طیف‌های نور ال‌ای‌دی در مقایسه با نور طبیعی گلخانه بر کیفیت نشاء حسن یوسف (*Solenostemon escutellariodes* 'Wizard Scarlet') و اطلسی (*Petunia* × *hybrida* 'Scarlet Eye')

پریا دهخدايي^۱ - سعید ریزی^۲ - مسعود قاسمی قهساره^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹

چکیده

یکی از روش‌های بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاهان، تغییر کیفیت نور است. به همین منظور آزمایشی جهت بررسی اثر کیفیت نور ال‌ای‌دی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک دانهال‌های حسن یوسف و اطلسی انجام شد. تیمارها شامل نور طبیعی گلخانه (شاهد) و نور ال‌ای‌دی (نور ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد و دیگری نور ۱۰۰ درصد سفید) بود. در پایان، تعدادی از صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سطح برگ، ارتفاع، طول میانگره، قطر ساقه، وزن تر شاخساره و فلورسانس کلروفیل برگ دانهال حسن یوسف در نور ۱۰۰ درصد سفید بیشتر از نور ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ ال‌ای‌دی و نور طبیعی گلخانه بود. همچنین، بیشترین دمای سطح برگ (۲۷/۴ درجه سلسیوس)، میزان کلروفیل کل (۰/۸ میلی‌گرم بر گرم) و کاروتنوئید (۲/۳۰ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار شاهد و بیشترین تعداد برگ (۲۱)، وزن خشک شاخساره (۰/۱۷ گرم)، وزن تر (۱/۶۵ گرم) و خشک ریشه (۰/۱۱ گرم) در ترکیب نوری ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ مشاهده شد. نتایج در نشاء اطلسی نشان داد که نور سفید باعث افزایش سطح برگ، وزن تر شاخساره و وزن خشک ریشه شد. دمای سطح برگ و میزان کلروفیل کل در شاهد نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود و بیشترین میزان کاروتنوئید (۳/۱۲ میلی‌گرم بر گرم) اطلسی در نور ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ حاصل شد. بر اساس نتایج بدست آمده، با جایگزینی شرایط گلخانه با نور ال‌ای‌دی می‌توان، نشاء حسن یوسف و اطلسی را با کیفیت بالاتری تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: فلورسانس کلروفیل برگ، کیفیت نور، نشاء، مورفولوژی

مقدمه

روشنایی گوناگون رفتارهای متفاوتی نشان می‌دهند (۲۶). در مناطقی که تابش نور خورشید برای حداقل رشد کافی نیست (۴۱) و در نواحی که طی زمستان نور کمی وجود دارد، استفاده از نور تکمیلی به‌صورت سیستم‌های خودکار در گلخانه حایز اهمیت است (۲۲) و می‌تواند رشد گیاهان را افزایش دهد (۱۰). کیفیت نور به تنهایی اثرات زیادی بر رشد، نمو و فیزیولوژی گیاه دارد (۳۸ و ۴۲).

طبق پژوهش انجام شده در دانشگاه پوردو برای تولید دانهال گیاهان بستری با کیفیت مطلوب، مقدار نور تجمعی روزانه (Daily Light Integral) تقریباً ۱۲-۱۰ مول بر مترمربع بر روز لازم است (۳۵). یکی از منابع تولید نور، ال‌ای‌دی‌ها هستند که الکتریسته را به نور تبدیل می‌کنند (۳۳). ال‌ای‌دی‌ها دارای فواید بسیاری از جمله اندازه کوچک، طول موج‌های ویژه، تولید گرمای کم، شدت نور قابل تنظیم، راندمان بالای تبدیل الکتریسته به نور، نیاز کمتر به هورمون‌های گیاهی و آفت‌کش‌ها، تولید بیشتر و گیاهان با کیفیت بهتر نسبت به سایر لامپ‌ها می‌باشند (۴۶ و ۴۸). از ال‌ای‌دی‌ها برای بررسی

گیاهان در تمام طول عمر خود از جوانه‌زنی تا تولید گل و بذر به نور نیاز دارند (۳۶ و ۴۹). طی رشد گیاهان، وجود منبع نور خورشید یا نور مصنوعی ضروری است (۲۰). نور تنها عامل برای انجام فتوسنتز در فرایند رشد گیاهان نیست اما فاکتور مهمی برای کنترل رشد است (۱۹، ۲۳ و ۲۴). سه پارامتر موثر بر رشد گیاه شامل مدت، کمیت (شدت) و کیفیت (طیف) نور می‌باشند (۴۹). شاخص‌هایی مثل ارتفاع گیاه، طول میانگره، تعداد انشعابات و اندازه برگ تحت تاثیر کمیت و کیفیت نور قرار می‌گیرند (۱۲). بطور کلی این سه پارامتر اثرات متفاوتی روی عملکرد گیاه می‌گذارند (۳۰). گیاهان در شدت‌های

۱ و ۲ - به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

(*) - نویسنده مسئول: (Email: mghasmi1352@gmail.com)

DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.79713

بیوستنز کلروفیل در گندم، افزایش طول ساقه و برگ کاهو استفاده شده است (۴۴). کمیت و کیفیت نور ال‌ای‌دی همچنین بر کیفیت گل بنفشه موثر بوده است (۳۷). در بررسی اثر چهار منبع نوری متفاوت ال‌ای‌دی به رنگ‌های سرخ (۶۵۰ nm)، زرد (۵۹۰ nm)، سبز (۵۵۰ nm)، آبی (۴۸۰ nm) و سفید (شاهد) با شدت ۳۰۰ لوکس به مدت ۱۵-۱۲ روز با ۲۴ ساعت روشنایی بر رشد دانهال نیلوفر آبی، افزایش طول گیاه در نور آبی نسبت به سایر تیمارها و کلروفیل بیشتر در نور سفید در مقایسه با نور سرخ و سبز مشاهده شد (۴۴). در آزمایش دیگری نور ترکیبی آبی و سرخ ال‌ای‌دی در مقایسه با تیمار ۱۰۰ درصد نور قرمز، آنتوسیانین برگ کاهو را افزایش داد (۲۹). تولید سریع نشاء با کیفیت بالا از راه کنترل شرایط محیطی برای تولید کننده اهمیت دارد و از عوامل مهم موثر بر درآمد است. یکی از راه‌های موثر در تسریع رشد و بهبود کیفیت نشاء تامین کیفیت بهینه نور در محیط رشد گیاه است.

حسن یوسف (*Solenostemon scutellarioides* L.) از تیره Lamiaceae گیاهی دائمی با برگ‌های رنگی است و نیاز به نور کامل و غیر مستقیم برای رشد و نمو دارد (۲). گیاه اطلسی (*Petunia hybrida* L. ×) از تیره Solanaceae (۱۱) در مناطق گرمسیری چند ساله و در مناطق سردسیری یکساله است. نیاز به نور کامل دارد (۴). حسن یوسف و اطلسی به ترتیب از گیاهان درون‌خانه‌ای و بستری پرمصرف در صنعت گیاهان زینتی هستند که مرحله تولید نشاء آنها از بذر نقش مهمی در کمیت و کیفیت نهایی محصول دارد. حسن یوسف حداقل مقدار نور تجمعی روزانه ۹ مول بر مترمربع بر روز و حداکثر ۱۸ مول بر مترمربع بر روز نیاز دارد (۴۴). مقدار نور تجمعی روزانه مورد نیاز اطلسی در مرحله تولید نشاء و پس از تثبیدن بذر بین ۱۰ تا ۲۲ مول بر مترمربع بر روز است (۱۶).

تا به امروز اطلاعات به نسبت کمی درباره اثر کمیت و کیفیت نور ال‌ای‌دی در گلخانه‌ها بعنوان نور تکمیلی و یا در اتاقک‌های رشد روی گیاهان منتشر شده است. با این حال کسب اطلاعات جهت کاربرد ال‌ای‌دی‌ها به عنوان منبع نور برای گیاهان زینتی اهمیت زیادی دارد. بنابراین این آزمایش به منظور مقایسه اثر کاربرد نور ال‌ای‌دی به رنگ های سفید، آبی و سرخ با نور طبیعی گلخانه (شرایط تولید رایج) روی تولید نشاء حسن یوسف رقم Wizard Scarlet و اطلسی رقم Scarlet Eye انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار سال ۱۳۹۶ در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار کیفیت متفاوت نور شامل نور طبیعی گلخانه (به عنوان شاهد)، نور ال‌ای‌دی شامل ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ و دیگری ۱۰۰ درصد نور سفید و ۱۰

تکرار روی دو گیاه حسن یوسف و اطلسی در اتاقک رشد و گلخانه انجام شد. بذرهای نسل اول اطلسی رقم Scarlet Eye و حسن یوسف رقم Scarlet Wizard در سینی کاشت ۱۰۵ خانه در بستری حاوی ۳۰ درصد پرلایت و ۷۰ درصد پیت‌ماس کشت شدند. پس از کاشت بذرها، سینی‌های کشت در اتاقک کشت در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد (Datalogger 8808 temp.+ RH) تحت دو تیمار مختلف نور ال‌ای‌دی شامل نور ترکیبی ۵۰ درصد آبی (۴۵۵-۴۵۰ نانومتر) + ۵۰ درصد سرخ (۶۶۵-۶۵۵ نانومتر) و تیمار ۱۰۰ درصد سفید (۳۰۰۰ کلون) قرار داده شدند. بر اساس آزمایش‌های مقدماتی شدت نور برای هر دو نشاء، در هر دو تیمار ال‌ای‌دی 60 ± 5 میکرومول بر مترمربع بر ثانیه در نظر گرفته شد و به کمک دستگاه پارمتر (مدل Apogee, MQ500, USA) تنظیم شد. فتوپریود به صورت ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی بود. برای مقایسه، همزمان گیاهان در گلخانه (به عنوان شاهد و نور طبیعی) با مقدار نور تجمعی روزانه 14 ± 5 مول بر مترمربع در روز، میانگین دما در طی شبانه روز 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد (Data logger 8808 temp.+ RH) نیز کشت شدند. پس از چهار برگی شدن دانهال‌ها، با کود یارامیلا (محصول کشور هلند) با فرمول $3+20-6-19$ Mgo+ TE به غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون کودآبیاری شدند. دو هفته پس از اولین کوددهی دوباره نشاءها با همین کود با غلظت مشابه تغذیه شدند.

در پایان، ۸ هفته پس از کاشت بذرها صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نشاءها شامل سطح برگ، تعداد برگ، دمای سطح برگ، وزن تر و خشک شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، فلورسانس کلروفیل برگ (F_v/F_m)، میزان کلروفیل و کاروتنوئید برگ اندازه‌گیری شد. افزون بر این شاخص‌ها در نشاء حسن یوسف ارتفاع، طول میانگره و قطر ساقه نیز اندازه‌گیری شد. سطح برگ با نرم افزار Digimizers 4 image analysis، دمای سطح برگ با دماسنج مادون قرمز و فلورسانس کلروفیل برگ (F_v/F_m) با دستگاه پم مدل Hansatech Instruments (Pulse-Amplitude-Modulated) (fluorometers) اندازه‌گیری شد. میزان رنگیزه‌های کلروفیل کل و کاروتنوئید به روش Lichtenthaler and Wellburn (۲۵) تعیین و با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Jenway 63200 در طول موج‌های ۶۴۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ قرائت و با استفاده از فرمول‌های شماره ۲ محاسبه گردید.

(۱)

Chlorophyll a ($\mu\text{g/ml}$) = $12.21 (A_{663}) - 2.81 (A_{646})$

Chlorophyll b ($\mu\text{g/ml}$) = $20.13 (A_{646}) - 5.03 (A_{663})$

Total chlorophyll = Chl a + Chl b

Carotenoides ($\mu\text{g/ml}$) = $1000 (A_{470}) - 3.27 (\text{chl. a}) - 104 (\text{chl. b}) / 227$

A663: میزان جذب نوری در طول موج ۶۶۳ نانومتر. A646:

نتایج

اثر کیفیت نور ال‌ای‌دی بر حسن یوسف

بر اساس جداول تجزیه واریانس ۱ و ۲ کیفیت‌های متفاوت نور باعث تفاوت معنی‌دار در تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده در حسن یوسف گردید ($P < 0.01$).

میزان جذب نوری در طول موج ۶۴۶ نانومتر. A470: میزان جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر. برای تعیین مقادیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت نتایج در $V/1000 W$ ضرب شد که در آن W: وزن تر نمونه برداشت شده به گرم و V: حجم نهایی استون ۸۰ درصد به میلی‌لیتر است. داده‌ها با برنامه SAS 9.4 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر کیفیت نور ال‌ای‌دی بر شاخص‌های مورفولوژیکی نشاء حسن یوسف

Table 1- Analysis of variance for the effect of natural light and LED light quality on morphological indices of *Solenostemon transplanta*

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	Mean squares								
		سطح برگ Leaf area	تعداد برگ Leaf number	طول میانگره Internode length	ارتفاع گیاه Plant height	قطر ساقه Stem diameter	وزن تر ساقه Shoot fresh weight	وزن خشک ساقه Shoot dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
نور Light	2	6.759**	185.200**	517/380**	30.954**	2.961**	4.985**	0.0516**	2.961**	0.0116**
خطا Error	27	0.236	4.829	5.481	0.215	0.128	0.035	0.0006	0.089	0.0006
ضریب تغییرات CV (%)	-	17.09	13.08	20.63	14.45	16.27	16.17	21.64	23.96	27.02

** : معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

** : Significant at 1% level.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر کیفیت نور طبیعی و ال‌ای‌دی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی نشاء حسن یوسف

Table 2- Analysis of variance for the effect of natural light and LED light quality on physiological indices of *Solenostemon transplanta*

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	Mean squares			
		دمای سطح برگ Leaf surface temperature	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoids	فلورسانس کلروفیل برگ Fv/Fm
Light (نور)	2	54.449**	0.276**	2.728**	0.006*
Error (خطا)	27	1.120	0.008	0.167	0.001
CV % (ضریب تغییرات)	-	4.28	13.82	22.73	4.80

** : معنی‌دار در سطح ۱ درصد، * : معنی‌دار در سطح ۵ درصد.

** : Significant at 1% level, * : Significant at 5% level.

صفات مورفولوژیکی

سانتی‌متر)، طول میانگره (۴/۲۳۵ میلی‌متر) و وزن تر شاخساره (۰/۳۷۳ گرم) در تیمار شاهد (گلخانه) مشاهده شد. بیشترین قطر ساقه در نور سفید (۲/۵۲۴ میلی‌متر) و طیف ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ (۲/۵۱۵ میلی‌متر) و کمترین قطر (۱/۵۷۷ میلی‌متر) در شاهد حاصل شد. بیشترین تعداد برگ (۲۱) و وزن خشک شاخساره

بر اساس جدول مقایسه میانگین، بیشترین سطح برگ (۳/۶۲۷ سانتی‌متر مربع)، ارتفاع (۵/۰۴۰ سانتی‌متر)، طول میانگره (۱۸/۶۱۸ میلی‌متر) و وزن تر شاخساره (۱/۷۳۵ گرم) حسن یوسف در نور سفید و کمترین مقدار سطح برگ (۱/۹۸۷ سانتی‌متر مربع)، ارتفاع (۱/۵۳۰

۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ و کمترین تعداد برگ (۱۲/۴۰) و وزن خشک شاخساره (۰/۰۳۷ گرم) در شرایط گلخانه (شاهد) مشاهده شد. از نظر وزن خشک شاخساره بین دو تیمار ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ (۰/۱۵۸ گرم) و نور سفید (۰/۱۶۵ گرم) تفاوت معنی‌دار نبود. بیشترین وزن تر (۱/۶۵۱ گرم) و خشک ریشه (۰/۱۱۴ گرم) حسن یوسف در نور ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ و کمترین وزن تر (۰/۶۲۹ گرم) و خشک ریشه (۰/۰۵۲ گرم) در شاهد مشاهده شد. همانند وزن خشک شاخساره، وزن تر و خشک ریشه در نور سفید با تیمار ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ تفاوت معنی‌دار نداشتند (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر کیفیت نور طبیعی و ال‌ای‌دی بر شاخص‌های مورفولوژیکی نشاء حسن یوسف

Table 3- Mean comparison of the effect of natural light and LED light quality on morphological indices of *Solenostemon* transplants

تیمار نوری Light treatment	سطح برگ Leaf area (cm ²)	تعداد برگ Leaf number	طول میانگره Internode length (mm)	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	قطر ساقه Stem diameter (mm)	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight (g)	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight (g)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)
Blue+Red (آبی+قرمز)	2.92 ^b	21.00 ^a	11.18 ^b	3.07 ^b	2.52 ^a	1.38 ^b	0.17 ^a	1.65 ^a	0.11 ^a
White (سفید)	3.63 ^a	17.00 ^b	18.62 ^a	5.04 ^a	2.52 ^a	1.74 ^a	0.16 ^a	1.47 ^a	0.12 ^a
Control (شاهد)	1.99 ^c	12.40 ^c	4.24 ^c	1.53 ^c	1.58 ^b	0.37 ^c	0.04 ^b	0.63 ^b	0.05 ^b

میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند.

The values in each column followed by the same letters are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test.

صفات فیزیولوژیکی

بیشترین مقدار کاروتنوئید (۲/۲۹۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار نور گلخانه بود و کمترین آن در نور ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ (۱/۲۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) حاصل شد. بیشترین فلورسانس کلروفیل برگ (۰/۸۲۷) در تیمار نور سفید مشاهده شد که با نور گلخانه تفاوت آن معنی‌دار نبود و کمترین مقدار (۰/۷۸۱) مربوط به تیمار ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ بود. فلورسانس کلروفیل برگ بین دو تیمار ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ و نور طبیعی تفاوتی نداشت (جدول ۴).

بیشترین دمای سطح برگ در تیمار شاهد (۲۷/۴۱) درجه سانتی‌گراد و کمترین دما در ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ (۲۳/۳۳) درجه سانتی‌گراد وجود داشت. بیشترین مقدار کلروفیل کل (۰/۰۸۰ میلی-گرم بر گرم وزن تر برگ) در تیمار نور گلخانه (شاهد) حاصل شد که با نور ال‌ای‌دی سفید (۰/۷۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تفاوت معنی‌دار نداشت. کمترین مقدار کلروفیل کل (۰/۴۹۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در نور ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ مشاهده شد.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثر کیفیت نور طبیعی و ال‌ای‌دی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی نشاء حسن یوسف

Table 4- Mean comparison of the effect of natural light and LED light quality on physiological indices of *Solenostemon* transplants

تیمار نوری Light treatment	دمای سطح برگ Leaf Surface temperature (°C)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg g ⁻¹ fw)	کاروتنوئید Carotenoids (mg g ⁻¹ fw)	فلورسانس کلروفیل برگ F _v /F _m
Blue+Red (آبی+قرمز)	23.33 ^c	0.49 ^b	1.26 ^c	0.78 ^b
White (سفید)	23.41 ^b	0.75 ^a	1.85 ^b	0.83 ^a
Control (شاهد)	27.41 ^a	0.80 ^a	2.30 ^a	0.79 ^b

میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند.

The values in each column followed by the same letters are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test..

اثر کیفیت نور طبیعی و ال‌ای‌دی بر اطلسی

وزن تر ریشه نشاء اطلسی تاثیر معنی‌دار نداشت (جدول ۵). کیفیت‌های مختلف نور روی تمام شاخص‌های فیزیولوژی به جز فلورسانس کلروفیل برگ اثر معنی‌دار داشت ($P < 0.01$) (جدول ۶).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در اطلسی بیانگر اثر معنی‌دار تیمارهای نوری بر شاخص‌های وزن تر شاخساره و وزن خشک ریشه و سطح برگ بود اما روی شاخص‌های تعداد برگ، وزن خشک ساقه و

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس اثر کیفیت نور طبیعی و ال‌ای‌دی بر شاخص‌های مورفولوژیکی نشاء اطلسی
Table 5- Analysis of variance for the effect of natural light and LED light quality on morphological indices of Petunia transplant

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	Mean squares					
		میانگین سطح برگ Leaf area mean	تعداد برگ Leaf number	وزن تر ساقه Shoot fresh weight	وزن خشک ساقه Shoot dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
Light (نور)	2	0.692*	10.133 ^{ns}	0.163**	0.0004 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.00037**
Error (خطا)	27	0.144	13.229	0.010	0.0001	0.006	0.00003
CV % (ضریب تغییرات)	-	24.69	26.87	28.45	27.25	19.09	26.15

** : معنی‌دار در سطح ۱ درصد، * : معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ^{ns} : فاقد اثر معنی‌دار در سطح ۵ درصد.
** : Significant at 1% level, * : Significant at 5% level. ns: no significant effect at 5% level.

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس اثر کیفیت نور طبیعی و ال‌ای‌دی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی نشاء اطلسی
Table 6- Analysis of variance for the effect of natural light and LED light quality on physiological indices of Petunia transplant

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	Mean squares			
		دمای سطح برگ Leaf surface temperature	کلروفیل کل Total chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoids	فلورسانس کلروفیل برگ Fv/Fm
Light (نور)	2	32.610**	0.472**	10.989**	0.012 ^{ns}
Error (خطا)	27	1.00	0.002	0.207	0.011
CV % (ضریب تغییرات)	-	4.18	4.37	20.89	15.46

** : معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ^{ns} : فاقد اثر معنی‌دار در سطح ۵ درصد.
** : significant at 1% level, ns: no significant effect at 5% level.

صفات فیزیولوژیکی

بیشترین مقدار کلروفیل کل (۱/۴۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) اطلسی در شاهد و کمترین (۱/۰۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در نور سفید مشاهده شد که با میانگین کلروفیل طیف ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ نور ال‌ای‌دی (۱/۰۶۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) تفاوت معنی‌دار نداشت. بیشترین مقدار کاروتنوئید (۳/۱۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در نور ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ و کمترین آن در شاهد (۱/۰۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) حاصل شد. بیشترین دمای سطح برگ (۲۶/۰۰ درجه سانتی‌گراد) مربوط به شاهد و کمترین مقدار (۲۲/۸۳ درجه سانتی‌گراد) مربوط به نور سفید ال‌ای‌دی بود (جدول ۸).

صفات مورفولوژیکی

بیشترین سطح برگ (۱/۷۴۲ سانتی‌متر مربع) در نور سفید ال‌ای‌دی حاصل شد که با نور گلخانه (۱/۶۳۸ سانتی‌متر مربع) تفاوت معنی‌دار نداشت. بیشترین میانگین وزن تر شاخساره (۰/۵۰۷ گرم) و وزن خشک ریشه (۰/۰۲۹ گرم) اطلسی مربوط به تیمار نور سفید و کمترین مقدار وزن تر شاخساره (۰/۲۸۴ گرم) و وزن خشک ریشه (۰/۰۱۷ گرم) مربوط به تیمار نور ال‌ای‌دی ترکیبی ۵۰ درصد آبی + ۵۰ درصد سرخ بود که مقدار هر دو فاکتور با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین اثر کیفیت نور طبیعی و ال ای دی بر شاخص های مورفولوژیکی نشاء اطلسی
Table 7- Mean comparison of the effect of natural light and LED light quality on morphological indices of Petunia transplants

تیمار نوری Light treatment	میانگین سطح برگ Leaf area average (cm ²)	وزن تر ساقه Shoot fresh weight (g)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)
Blue+Red (آبی+قرمز)	1.24 ^b	0.28 ^b	0.02 ^b
White (سفید)	1.74 ^a	0.51 ^a	0.03 ^a
Control (شاهد)	1.64 ^a	0.29 ^b	0.02 ^b

میانگین ها با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی باشند.

The values in each column followed by the same letters are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test.

جدول ۸- مقایسه میانگین اثر کیفیت نور طبیعی و ال ای دی بر شاخص های فیزیولوژیکی نشاء اطلسی
Table 8- Mean comparison of the effect of natural light and LED light quality on physiological indices of Petunia transplants

تیمار نوری Light treatment	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg g ⁻¹ fw)	کارتنوئید Carotenoids (mg g ⁻¹ fw)	دمای سطح برگ Leaf surface temperature (°C)
Blue+Red (آبی+قرمز)	1.06 ^b	3.12 ^a	22.91 ^b
White (سفید)	1.06 ^b	2.37 ^b	22.83 ^c
Control شاهد	1.44 ^a	1.05 ^c	26.00 ^a

میانگین ها با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی باشند.

The values in each column followed by the same letters are not significantly differentns ($P < 0.05$) based on LSD test..

بحث

از تفاوت در نیاز نوری گیاهان باشد چون حسن یوسف به عنوان یک گیاه درون خانه ای در مقایسه با گیاهان بستری شدت نور کمتر را تحمل می کند. از سوی دیگر در مقایسه اثر شرایط نوری مختلف بر ارتفاع گیاهان تعداد برگ را باید در نظر گرفت چون نور کم با افزایش فاصله میانگره باعث افزایش ارتفاع خواهد شد. در اطلسی نیز گزارش شده که نور آبی در مقایسه با نور سرخ (۱۳) باعث افزایش ارتفاع شده است. همچنین نتایج آزمایشی که روی حنا و اطلسی تحت تیمارهای نوری آبی، قرمز، نور ترکیبی آبی و قرمز و لامپ فلورسنت نشان داد که نور سرخ در حنا و نور آبی در اطلسی قطر ساقه را افزایش داده است (۱). از نظر تعداد برگ نیز گزارش های متعددی مبنی بر افزایش تعداد برگ در اثر نور سرخ و آبی وجود دارد. نور سرخ در گوجه فرنگی (۸، ۲۱) و کاهو نسبت به نور آبی (۲۱) و نور سرخ - نارنجی ال ای دی در بنفشه در مقایسه با طیف های آبی، قرمز، سفید و سبز (۲۲) باعث افزایش تعداد برگ شده است. همچنین نور آبی در کلم بروکلی (۳۲)، حنا و آهار (۱) در مقایسه با نور ترکیبی آبی و قرمز تعداد برگ را افزایش داده است. نتایج آزمایش ما نیز بیانگر اثر افزایشی نور سرخ +

بر اساس نتایج، بطور کلی نور ال ای دی در حسن یوسف باعث افزایش ارتفاع و طول میانگره نسبت به شرایط گلخانه گردید و مقدار آن ها در نور سفید ال ای دی بهتر بود. از سوی دیگر بیشترین تعداد برگ حسن یوسف در نور ترکیبی آبی + سرخ و کمترین آن در شاهد مشاهده شد. از نظر قطر ساقه نیز کمترین مقدار مربوط به شرایط نور گلخانه بود. نورهای ال ای دی به کار رفته قطر ساقه را افزایش داد. مجموع این نتایج بیانگر آن است که در حسن یوسف نور ال ای دی برتر از نور گلخانه بوده است. نور ترکیبی سرخ + آبی باعث ایجاد گیاهان متراکمتری نسبت به نور ال ای دی سفید شده است. هئو و همکاران (۲۰۰۲) در مریم گلی و جعفری نشان دادند که نور سرخ در مقایسه با نور آبی و سرخ باعث کاهش ارتفاع می شود (۱۵). از سوی دیگر گفته شده نور سرخ - نارنجی محرک طویل شدن هیپوکوتیل و ساقه است. سو و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش شده که نور سرخ و آبی ال ای دی باعث افزایش ارتفاع دانهال خیار نسبت به نور آبی و سرخ لامپ رشته ای گردید (۴۳). این تفاوت در نتایج به احتمال ناشی

آبی ال‌ای‌دی روی ارتفاع، تعداد برگ و قطر ساقه حسن یوسف است که با گزارش‌های فوق همسو است. اگرچه مقدار ارتفاع، تعداد برگ و قطر ساقه دانه‌ها در نور سفید ال‌ای‌دی برتر از شاهد است اما به دلیل ایجاد میانگره‌های طولی‌تر کیفیت گیاهان نسبت به ال‌ای‌دی سرخ + آبی برتر بود.

از نظر میانگین سطح برگ در آزمایش ما گیاهان در نور ال‌ای‌دی سفید نسبت به نور گلخانه پهن‌تر بودند. بنابراین بالا بودن میانگین سطح برگ در نور سفید می‌تواند بیانگر ناکافی بودن نور برای گیاه باشد چون یکی از روش‌های جبران کمبود نور در گیاه افزایش سطح برگ است (۱۴).

سامولتین و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که نور ترکیبی سرخ و آبی نسبت به طیف‌های تکی آبی و سرخ سطح برگ را کاهش می‌دهد (۳۹). از طرفی نتایج آزمایش کشت گوجه فرنگی، مریم‌گلی، پامچال و حنا زیر نور ال‌ای‌دی با شدت نور فتوسنتزی ۱۶۰ میکرومول بر مترمربع با درصد‌های متفاوتی از نورهای آبی، سبز و سرخ باعث افزایش سطح برگ نسبت به تیمار شاهد (نور سفید فلورسنت) شده است (۴۷). نور زیاد اگرچه باعث ایجاد برگ‌های کوچک‌تر نسبت به نور کم می‌شود، اما سطح کل برگ گیاهان رشد یافته در نور زیاد بیشتر است چون آنها به طور معمول تعداد برگ بیشتری تولید می‌کنند (۱۴).

از نظر وزن تر و خشک شاخساره تیمارهای نور ال‌ای‌دی نسبت به شاهد برتر بودند و اگرچه از نظر وزن تر شاخساره گیاهچه‌های اطلسی و حسن یوسف رشد یافته در نور سفید ال‌ای‌دی وزن تر بیشتری داشتند اما از نظر وزن خشک شاخساره و وزن تر و خشک ریشه حسن یوسف بین تیمارهای نور ال‌ای‌دی سفید و سرخ + آبی ال‌ای‌دی تفاوت معنی‌دار نبود. بنابراین می‌توان گفت نور ال‌ای‌دی سفید رشد بهتری را باعث شده است.

طبق بررسی جوکان و همکاران (۲۰۱۰) نور سرخ- نارنجی (۶۰۰-۷۰۰ نانومتر) نسبت به نور سبز وزن گیاه را افزایش داده است (۱۸). Li و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که وزن تر ریشه و ساقه کاهو چینی در نور سرخ با شدت ۸۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه افزایش یافت (۲۵). در آزمایش دیگری مشاهده شده که نور سرخ روی افزایش وزن دانه‌های گوجه فرنگی (۸، ۲۱) و خیار (۴۳) نسبت به نور آبی موثر بوده است. پاردو و همکارانش (۲۰۱۴) اثر نور ال‌ای‌دی با شدت بالا (high-intensity LED light) با رنگ‌های آبی، سرخ و سبز را به طور جداگانه بر جوانه‌زنی سه رقم کاهو با مدت ۳۲ زمان روشنائی متفاوت بررسی کردند (۳۲) و براساس نتایج این محققین، با افزایش مدت روشنائی، وزن تر و خشک بیشتر شد. نتایج پژوهش دیگری مربوط به گوجه فرنگی، مریم‌گلی، پامچال و حنا نشان داد که در نورهای آبی، سرخ و سفید با شدت ۱۶۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه وزن تر شاخساره افزایش یافته است

(۴۷). همچنین پرورش کاهو و کلم بروکلی زیر نور ال‌ای‌دی‌های آبی، سرخ و سبز باعث افزایش وزن تر و خشک گیاه شده است (۳۲). طبق سامولتین و همکاران (۲۰۱۰) تحت تیمارهای نوری آبی، سرخ و ترکیبی آبیو سرخ نشان داد که نور ترکیبی سرخ و آبی وزن ریشه را در توت فرنگی افزایش داد (۳۹). نور سرخ- نارنجی (۶۰۰-۷۰۰ نانومتر) ال‌ای‌دی در مقایسه با سایر طیف‌های آبی، سرخ، سبز و سفید نیز بر افزایش وزن ساقه و ریشه در بنفشه (*Viola cornuta*) مؤثر بوده است (۲۲). بنابراین همسو با دیگر پژوهشگران نور ال‌ای‌دی در حسن یوسف و اطلسی سبب افزایش وزن گیاه نسبت به نور خورشید (گلخانه) شده است اما هر دو گونه به کیفیت نور ال‌ای‌دی پاسخ متفاوتی نشان دادند.

بیشترین دمای سطح برگ در گیاهان در حال رشد زیر نور گلخانه مشاهده شد و این می‌تواند دلیل کمتر بودن رشد ریشه و شاخساره گیاهان در نور گلخانه در اثر افزایش مقدار تنفس نسبت به گیاهان زیر نور ال‌ای‌دی باشد. ال‌ای‌دی‌ها پرتو فروسرخ کمتری نسبت به نور خورشید و سایر لامپ‌ها دارند، در نتیجه دما در تاج گیاهان کمتر است (۷). گاهی افزایش انرژی در سطح برگ سبب کاهش تعرق و در نتیجه افزایش دمای تاج گیاه می‌شود (۹) که این عامل سبب کاهش رشد گیاه خواهد شد. از سوی دیگر از نظرصرفه‌جویی در هزینه‌های تهویه هوا و کاهش نیاز آبی گیاهان به دلیل تولید گرمای کمتر توسط ال‌ای‌دی‌ها، می‌تواند برای تولیدکنندگان حایز اهمیت باشد (۴۶).

مقدار کلروفیل کل برگ حسن یوسف در نور گلخانه و نور سفید ال‌ای‌دی نسبت به نور ترکیبی آبی + سرخ و مقدار کلروفیل کل اطلسی در شاهد نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. فیزیولوژیست‌های گیاهی سعی می‌کنند، طول موج‌های بهینه نور را برای دامنه وسیعی از فرایندهای گیاهی تعیین کنند که گاهی با نتایج متناقض روبه‌رو می‌شوند، چون طیف فعال ویژه‌ای برای جنس‌های گیاهی مختلف لازم است (۱۴)، که بررسی پژوهش‌ها روی گیاهان مختلف بیانگر این موضوع است. به طوری که شاین و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که کلروفیل در گیاهان کاهوی رشد یافته در نور سرخ ال‌ای‌دی در مقایسه با نور ۱۰۰ درصد آبی و نور ترکیبی سرخ + آبی کمتر بود (۴۰). لی و کوباتا (۲۰۰۹) نیز عدم تفاوت کلروفیل دانه‌های کاهو در نور سفید و سرخ نسبت به نورهای آبی، سبز و فروسرخ را گزارش کردند (۲۴). رندال و لوپز (۲۰۱۴-الف) نشان دادند که نور سرخ و آبی ال‌ای‌دی با نسبت ۷۰:۳۰ در شمعدانی و مریم‌گلی باعث افزایش کلروفیل نسبت به لامپ‌های پرفشار سدیمی گردید (۳۴). بررسی اثر نورهای سرخ، سفید و آبی بر پینه رویانزا در کشت روی شیشه‌ای سنبل نشان داد که کلروفیل و کاروتنوئید در نور سرخ کاهش می‌یابد (۵). بررسی اثر نورهای خورشید و کاربرد نورهای ال‌ای‌دی سرخ و آبی به صورت تکمیلی (همراه نور خورشید) و یا به تنهایی (در سایه) در اطلسی نشان داد که مقدار کلروفیل زیر نور خورشید همراه با نور

سرخ ال ای دی بیشتر از سایر تیمارها بود (۱۳).

در سلول های مزوفیل سبز، کاروتنوئیدها به عنوان رنگیزه های کمکی در فرایند فتوسنتز نقش دارند و به ویژه در زمان انتقال انرژی و الکترون درگیر هستند و از رنگیزه کلروفیل در برابر صدمات ناشی از اکسیداسیون نوری محافظت می کنند. کاروتنوئیدها به عنوان رنگیزه کمکی نور دریافتی را به کلروفیل b منتقل می کنند و از فعالیت گونه های فعال اکسیژن در شرایط تنفس نوری جلوگیری می کنند (۱۷، ۲۸ و ۳۱). مقدار کاروتنوئید دانه های حسن یوسف در گلخانه بیشتر از سایر تیمارها بود که شاید ناشی از زیاد بودن انرژی نور باشد. مقدار کلروفیل کل اطلسی در نور آبی + سرخ ال ای دی کمتر از شاهد بوده و احتمالاً افزایش کاروتنوئید در این طیف ترکیبی نسبت به سایر تیمارها خاطر نقش حافظی که در بالا گفته شد باشد تا با بیشتر شدن کاروتنوئید بتواند از تجزیه کلروفیل جلوگیری و به ساخت آن کمک کند.

فلورسانس کلروفیل شامل F_0 (حداقل فلورسانس از برگ سازگار شده با تاریکی)، F_m (حداکثر فلورسانس در برگ سازگار شده با تاریکی)، F_v (میزان تغییر فلورسانس یا فلورسانس متغیر از برگ سازگار شده با تاریکی) و F_v/F_m (حداکثر کارایی یا عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در شرایط سازگار شده با تاریکی) می باشد (۲۷). پارامتر F_v/F_m بیانگر حداکثر کارایی کوانتوم فتوسیستم II است که در آن نور توسط گیرنده های نوری فتوسیستم II جذب می شود. بنابراین از شاخص عملکرد فتوسنتز گیاه می باشد (۳، ۶، ۲۷). در شرایط بدون تنش میزان F_v/F_m گیاه بین ۰/۷۵ تا ۰/۸۵ متغیر است (۶). در

آزمایش ما مقدار F_v/F_m در هر سه تیمار در محدوده طبیعی قرار دارند. با این حال بیشترین مقدار مربوط به نور ال ای دی سفید است و بین تیمارهای شاهد و نور ترکیبی سرخ + آبی تفاوت معنی دار نیست.

نتیجه گیری

کیفیت نور تاثیر زیادی بر رشد و توسعه گیاهان دارد و یک ابزار قوی برای کنترل فرآیندهای مختلف است. نتایج این پژوهش نشان داد که منابع نور مصنوعی با کیفیت های مختلف اثرات متفاوتی را در گونه های مختلف گیاهی ایجاد می کند و ال ای دی ها می توانند جایگزین نور طبیعی، در اتاقک های رشد و در مناطقی که نور کافی نیست، به ویژه در مرحله تولید نشاء، باشند. با توجه به افزایش کیفیت و کاهش تلفات نشاء گیاهان در مرحله انتقال و کم مصرف بودن آنها از نظر هزینه های تولید قابل توجه هستند. لازم به ذکر است افزون بر نور، دما، رطوبت و سایر عوامل محیطی نیز در تولید نشاء موثر هستند. با توجه به مجموع شاخص های اندازه گیری شده در حسن یوسف می توان نتیجه گرفت که در مرحله تولید نشاء نور ال ای دی سرخ + آبی برتر از سایر تیمارها است. در اطلسی تیمار نور سفید ال ای دی باعث بیشترین وزن تر شاخساره و وزن تر و خشک ریشه و سطح برگ گردید. همانند حسن یوسف بیشترین دمای سطح برگ و کلروفیل مربوط به تیمار شاهد بود و با توجه به مجموع شاخص های اندازه گیری شده تیمار نور سفید ال ای دی برای تولید نشاء اطلسی برتر بود.

منابع

- 1- Akbarian B., Matloobi M., and Mahna N. 2016. Effects of LED Light on Seed Emergence and Seedling Quality of Four Bedding Flowers. Journal of Ornamental Plants 2: 115-123.
- 2- Anonymous. 2017. Gulf Coast Research and Education Center Plant City Teaching Garden. University of Florida. IFAS Extension. Available at <http://gcrec.ifas.ufl.edu/GCREC-Garden/docs/pdf/Coleus.pdf> (visited 10 July 2018).
- 3- Araus J.L., Amaro T., Voltas J., Nakkoul H., and Nachit M.M. 1998. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. Field Crops Research 55: 209-223.
- 4- Armitage A.M. 1985. Petunia. In: A.H. Halevy (ed.). In Handbook of flowering. CRC press, Boca Raton Florida. PP. 41-46.
- 5- Bach A., and Krol A. 2001. Effect of light quality on somatic embryogenesis in *Hyacinthus orientalis* L. 'Delfts Blue'. Biological Bulletin of Poznan 38: 103-107.
- 6- Baker N.R., and Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany 55: 1607-1621.
- 7- Barta D.J., Tibbitts T.W., Bula R.J., and Morrow R.C. 1992. Evaluation of light emitting diode characteristics for a pace-based lant irradiation source. Space Research 12: 141-149.
- 8- Brazaityte A., Duchovskis P., Urbonaviciute A., Samuolene G., Jankauskiene Sakalauskaite J., Šabajeviene G., Sirtautas R., and Novickovas A. 2010. The effect of light-emitting diodes lighting on the growth of tomato transplants. Zemdirbyste Agriculture 97: 89-98.
- 9- Carcova J., Maddonni G.A., and Ghera C.M. 1998. Crop water stress index of three maize hybrids grown in soils with different quality. Field Crops Research 55: 165-174.
- 10- Chia P.L., and Kubota C. 2010. End-of-day far-red light quality and dose requirements for tomato rootstock hypocotyl elongation. HortScience 45: 1501-1506.

- 11- Dole J.M., and Wilkins H.F. 1999. Floriculture: Principles and Species. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- 12- Fan X.X., Xu Z.G., Liu X.Y., Tang C.M., Wang L.W., and Han X.L. 2013. Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Scientia Horticulturae* 153: 50-55 .
- 13- Gautam P. 2012. Effect of light quality in the regulation of morphology and flowering of petunia (*Petunia hybrida*). *Department of Plant and Environmental Sciences* 15: 1-73.
- 14- Ghasemi Ghehsareh M., and Kafi M. 2015. Volume Two: Scientific and Practical floriculture (Second Edition). Publishing Author, Iran.
- 15- Heo J., Lee C., Chakrabarty D., and Paek K.Y. 2002. Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light-emitting diode (LED). *Plant Growth Regulation* 38: 225-230.
- 16- [https:// www. Syngenta flowers-us.com/ techlibrary/ search/ techlibrary/ type/ culture-sheet 111? search_ api_ views_ fulltext = petunia and items_per_page=24](https://www.syngenta-flowers-us.com/techlibrary/search/techlibrary/type/culture-sheet/111?search_api_views_fulltext=petunia&items_per_page=24) (visited 8 October 2018).
- 17- Jahns P., and Holzwarth A.R. 2012. The role of the xanthophyll cycle and lutein in photoprotection of photosystem II (Review). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817:182-193.
- 18- Johkan M., Shoji K., Goto F., Hahida S., and Yoshihara T. 2012. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. *Environmental and Experimental Botany* 75: 128–133.
- 19- Jung E.S., Lee S., Lim Sh., Ha Sh., Liu Kh., and Lee Ch. 2013. Metabolite profiling of the short-term responses of rice leaves (*Oryza sativa* cv. Ilmi) cultivated under different LED lights and its correlations with antioxidant activities. *Plant Science* 210: 61- 69 .
- 20- Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., and Sager J.C. 2004. Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and blue-light-emitting diodes. *HortScience* 39: 1617-1622 .
- 21- Koksall N., İncesu M., and Teke A. 2013. Effects of led lighting on plant development of tomato. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi* 6: 71-75 .
- 22- Koksall N., İncesu M., and Teke A. 2015. Supplemental LED lighting increases pansy growth. *Horticultura Brasileira* 33: 428-433.
- 23- Lee S.H., Tewari R.K., Hahn E.J., and Paek Y. 2007. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 141-151.
- 24- Li Q., and Kubota C. 2009. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany* 67: 59-64.
- 25- Lichtenthaler H.K., and Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different Solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- 26- Mani R. 2015. The effects of LEDs on plants. Maximum Yield. Available at [http :// maximumyield. com/blog/2015/06/01/the-effects-of-leds-on-plants](http://maximumyield.com/blog/2015/06/01/the-effects-of-leds-on-plants) (visited 12 January 2018).
- 27- Maxwell K., and Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- 28- Mlodzinska E. 2009. Survey of plant pigments: molecular and environmental determination of plant colors. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51: 7-16.
- 29- Nicole C.C.S., Charalambous F., Martinakos S., van de Voort S., Li1 Z., Verhoog M. and Krijn M. 2016. Lettuce growth and quality optimization in a plant Factory. *Acta Horticulturae* 1134: 1134-31.
- 30- Nishio J.N. 2000. Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant Cell and Environ* 23: 539-548.
- 31- Ougham H., Morris P., and Thomas H. 2005. The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Current Topics in Developmental Biology*, 66:135-160.
- 32- Pardo G.P., Aguilar C.H., Martínez F.R., Pacheco C.D., Gonzalez M.M., and Canseco M.M. 2014. Effects of light emitting diode high intensity on growth of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Broccoli (*Brassica oleracea* L.) seedlings. *Annual Research and Review in Biology* 4: 2983-2994.
- 33- Pimputkar S., Speck J.S., DenBaars S.P., and Nakamura S.H. 2009. Prospects for LED lighting. *Nature Photonics* 3: 180-183 .
- 34- Randall W.C., and Lopez R.G. 2014a. Comparison of supplemental lighting from high-pressure sodium lamps and light-emitting Diodes during Bedding Plant Seedling Production. *HortScience* 49(5): 589–595.
- 35- Randall W.C., and Lopez R.G. 2014b. Lighting the future of young plants. How can growers use led lights for supplemental and sole-source lighting?. Available at www.gpnmag.com (visited 2 January 2018).
- 36- Runkle E., and Blanchard M. 2010. Use of lighting to accelerate crop timing. *Greenhouse Grower*, Available at: [http:// www.flor.hrt.msu.edu/assets/PdfAttachments/Runkle-Blanchard-UseofLighting.pdf](http://www.flor.hrt.msu.edu/assets/PdfAttachments/Runkle-Blanchard-UseofLighting.pdf). (visited 14 November 2018).
- 37- Runkle E., and Heins R. 2004. Florel on summer production of pansy. Available at: [https:// gpnmag .com/ article/florel-summer-production-pansy](https://gpnmag.com/article/florel-summer-production-pansy). (visited 14 November 2018)

- 38- Sage L.C. 1992. Pigment of the imagination: a history of phytochrome research. Academic Press, London.
- 39- Samuoliene G., Brazaityte A., Urbonaviciute A., Šabajeviene G., and Duchovskis P. 2010. The effect of red and blue light component on the growth and development of frigo strawberries. *Zemdirbyste-Agriculture* 97: 99-104 .
- 40- Shin Y.S., Lee M.J., Lee E.S., Ahn J.H., Lim J.H., Kim H.J., Park H.W., Um Y.G., Park S.D., and Chai J.H. 2012. Effect of leds (light emitting diodes) irradiation on growth and mineral absorption of lettuce (*Lactuca sativa* 'Lollo Rosa'). *Journal of Bio-Environment Control* 21: 180-185.
- 41- Singh D., Basu Ch., Meinhardt-Wollweber M., and Roth B. 2014. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. *Hannover Centre for Optical Technologies* 49: 1-22.
- 42- Smith H. 1982. Light quality, photoperception, and plant strategy. *Plant Physiology* 33: 481-518.
- 43- Su N.N., Wu Q., and Cui J. 2012. Effects of supplemental lighting with led light quality on growth and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings. *China Vegetables* 1: 48-54.
- 44- Surducan V., Lung I. and Surducan E. 2009. The effect of coloured light on *Ipomoea Purpurea* growth. *National Institute for Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies* 182: 65-103.
- 45- Tripathy B.C., and Brown C.S. 1995. Root-shoot interaction in the greening of wheat seedlings grown under red light. *Plant Physiology* 107: 407-411 .
- 46- Verkbert H., Heins R., and Blom T. 2004. Supplemental lighting on potted plants. In: P.R. Fisher and E. Runkle (eds.). *Lighting up profits: Understanding greenhouse lighting*, p. 72-78.
- 47- Wells K. 2015. LED lighting and its effect on plants, growers and the world. While the initial nvestment may seem costly, the benefits of led lighting are certainly worth a consideration. Available at: <http://www.gpnmag.com> (visited 7 October 2018).
- 48- Wollaeger H., and Runkle E. 2014. Growing seedings under LEDs: part two. *Greenhouse Grower*. Available at: <https://www.greenhousegrower.com/production/plant-culture/ growing-seedlings-under-leds-part-two>. (visited 20 November 2018).
- 49- Yeh N., and Chung J.P. 2009. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13: 2175-2180.
- 50- Zhang T., and Folta K.M. 2012. Green light signaling and adaptive response. *Plant Signaling and Behavior* 7: 1-4.



The Effect of the Light-Emitting Diode Spectrum Compared to the Greenhouse Natural Light on the Quality of *Solenostemon escutellarioides* 'Wizard Scarlet' and *Petunia × hybrida* 'Scarlet Eye' Transplant

P. Dehkhodaei¹- S. Reezi²- M. Ghasemei Ghehsareh^{3*}

Received: 24-04-2019

Accepted: 10-07-2019

Introduction: The light is not only a photosynthesis energy source but also is a plant growth and development stimulation from germination to flower initiation process. The light quality plays an important role in all steps of growth process particularly in photosynthesis and morphological properties of plant species. Studies have reported that, LEDs present the maximum PAR efficiency among artificial lighting systems. LED lamps contribute to energy saving by 75 and 30 percent as compared to incandescent light bulbs and fluorescent lamps, respectively. LEDs emit blue, red, orange, yellow, green, red, and infrared light and can be used as a hybrid spectrum. For these reasons, an experiment was conducted to investigate the effect of quality of LED light on morphological and physiological characteristics of *Solenostemon* and *petunia*.

Materials and Methods: Research experiments were conducted on *Solenostemon escutellarioides* 'Wizard Scarlet' and *Petunia × hybrida* 'Scarlet Eye' in a completely randomized design with three treatments of different light quality and 10 replications. The seeds were planted in 105-cell seedling trays and in a mixture of 70% peat moss and 30% perlite. Seedlings were grown in natural greenhouse (control) and LED (50% blue + 50% red and 100% white light). The light intensity was $60 \pm 5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for LEDs and the daily greenhouse cavity was $5 \pm 14 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Since the main goal of the study was to compare the effect of LED light quality with sunlight in conventional greenhouse conditions. The LED treatments were applied from the germination until seedling production stage in a growth chamber with the light/dark regime of 18/6 hours, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ temperature, and $50 \pm 5\%$ relative humidity. While, their tray in the greenhouse with $55 \pm 5 \text{ mol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ DLI, $21 \pm 5^\circ\text{C}$ average daily temperature and $50 \pm 5\%$ relative humidity (Data logger 8808 temp. + RH) were regarded as the control treatment. After eight weeks, the morphological and physiological traits were recorded. Finally, the data were statistically analyzed with SAS (9.4) software package, and the means were compared by LSD test at $p < 0.05$ level.

Results and Discussion: At the end of study, some morphological and physiological traits were evaluated. The results showed that the leaf area average (3.63 cm^2), height (5.04 cm), internode length (18.62 mm), stem diameter (2.52 mm), shoot fresh weight (1.74 g) and chlorophyll fluorescence (0.83) of *Solenostemon* seedlings in 100% white light were more than 50% blue + 50% light green and greenhouse light. Also, the highest leaf area temperature (27.4°C), total chlorophyll ($0.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw}$) and carotenoids ($2.229 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw}$) were related to control treatment and the highest number of leaves (21), shoot dry weight (0.165 g), fresh (1.65 g) and root dry weight (0.114 g) were observed in 50% blue + 50% red light composition. According to the results of *petunia*, white LED light increased leaf area (1.74 cm^2), shoot fresh weight (0.51 g) and root dry weight (0.03 g). The leaf surface temperature (26°C) and total chlorophyll content ($1.44 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw}$) in the control group were higher than the other treatments, and the carotenoids content ($3.12 \text{ mg g}^{-1} \text{ fw}$) was obtained in 50% red + 50% blue LED. The leaf surface temperature and total chlorophyll content in greenhouse light were higher than other treatments and the highest carotenoids (3.119 mg / g) were obtained from 50% red + 50% blue LED.

Conclusion: Light quality has a great impact on the growth and development of plants and is a powerful tool for controlling various processes. The results showed that different light sources with different qualities had different effects on different plant species and that LEDs could replace natural light in growing chambers and in areas where light was insufficient. Due to the increased quality and reduced transplant losses in the transplant phase and their low utilization, they are justified in terms of production costs. It should be noted that in addition to light; temperature, humidity and other environmental factors are also effective in transplant production. Based on the measured indices in *Solenostemon*, it can be concluded that the red + blue LED light transplanting stage is

1, 2 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professors, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahrood University, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: mghasemi1352@gmail.com)

superior to other treatments. In petunia, white LED treatment caused the highest shoot and fresh and dry weights of roots and leaves respectively. Like Solenostemon, the highest chlorophyll and leaf surface temperatures were related to the control treatment and was superior to the petunia transplant in terms of the sum of measured indices of white light treatment.

Keywords: Leaf chlorophyll fluorescence, Light quality, Morphology, Transplant



تأثیر تنش شوری درون شیشه‌ای بر شاخص‌های رشدی، محافظت اسمزی و تنش اکسیداتیو در پینه گیاه قرنفل

عابدین مشعشی^۱ - محمد مهدی جوکار^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۳

چکیده

قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) یکی از مهمترین گیاهان فضای سبز در مناطق معتدل است که به عنوان گیاه باغچه‌ای، گل‌دانی و همچنین گل‌بریدنی کشت می‌گردد. شوری خاک و آب در بخش‌های وسیعی از کشور مهمترین مشکل پیش‌رو در گسترش فضای سبز شهری آن می‌باشد. با توجه به اهمیت قرنفل در فضای سبز شهری و درک بهتر مبانی فیزیولوژیکی پاسخ گیاه به تنش در محیط درون شیشه‌ای، در این پژوهش تأثیر تنش شوری بر گیاه قرنفل در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پینه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ که در محیط کشت MS حاوی ۲ میکرومولار BAP + ۶ میکرومولار NAA پرآوری گردیده بودند، تحت تأثیر سطوح مختلف کلریسدیم (۰، ۱، ۳، ۶ و ۱۲ گرم در لیتر) در محیط کشت MS قرار گرفتند. سپس شاخص‌های مختلف فیزیولوژیکی (همچون رشد، نرخ رشد نهایی، وزن تر و خشک) و بیوشیمیایی (همچون میزان تغییرات پروتئین کل، اسمولیت گلاسن-بتائین، فعالیت آنزیم بتائین آلدهیددهیدروژناز و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز و میزان بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدهاید) در پینه‌های تنش‌یافته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش سطح تنش، رشد پینه‌ها کاهش و در نتیجه از وزن تر و خشک آن‌ها نیز کاسته شد. از سوی دیگر میزان پروتئین کل، فعالیت آنزیم بتائین آلدهیددهیدروژناز و در نتیجه اسمولیت گلاسن-بتائین با افزایش سطح تنش، افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد همچون کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز نیز با افزایش میزان تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت. در بین سه آنزیم شکارکننده رادیکال آزاد، پراکسیداز کمترین میزان فعالیت و کاتالاز بیشترین میزان فعالیت را در نتیجه تنش داشتند. پراکسیداز همچنین کمترین میزان افزایش فعالیت در نتیجه تنش را به خود اختصاص داد. این در حالی بود که افزایش میزان فعالیت در دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسیددسموتاز تقریباً به یک اندازه مشاهده گردید. بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدهاید نیز علیرغم افزایش فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد با افزایش تنش شوری، افزایش یافت. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای به تنش شوری حساس بوده و آستانه تحمل آن به شوری محیط غلظت ۱ گرم در لیتر کلریسدیم می‌باشد. این در حالی است که، پینه‌های این گیاه تا شوری ۱۲ گرم در لیتر کلریسدیم مقاوم بوده و ضمن رشد بطئی به حیات خود ادامه دادند.

واژه‌های کلیدی: بتائین آلدهیددهیدروژناز، سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، گلاسن-بتائین، مالون‌دی‌آلدهاید

مقدمه

مهمترین گیاهان زینتی در مناطق معتدل می‌باشد که هم به جهت زیبایی و تنوع بالا و هم از نظر ارزش اقتصادی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (۳ و ۲۲). گل‌ها در قرنفل به صورت منفرد یا به تعداد زیاد در یک گل‌آذین چترمانند در اندازه کوچک و به رنگ‌های صورتی، سفید، قرمز، ابلق و خالدار ظاهر می‌گردد. به دلیل تنوع رنگ گل‌ها در این گیاه و به دلیل فراوانی تعداد گل در هر بوته، باغچه‌ها و حاشیه‌های گلکاری شده با قرنفل یک پارچه و بسیار زیبا بوده و این امر موجب استقبال زیاد از این گل در فضاهای سبز گردیده است (۲۱، ۲۲ و ۳۱). علاوه بر کاربردهای مختلف زینتی همچون گل فصلی باغچه‌ای، گل‌دانی و بریدنی (۱۸)، از برگ، ساقه و گل‌های گیاه قرنفل برای استحصال بسیاری از ترکیبات دارای خواص بالای دارویی جهت

گل فصلی قرنفل با نام علمی *Dianthus barbatus* L. به خانواده میخک‌سانان (Caryophyllaceae) و جنس *Dianthus* تعلق دارد. قرنفل، گیاهی دوساله، بومی مناطق مدیترانه‌ای و یکی از

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

(Email: mjowk@iauksh.ac.ir)

(*)- نویسنده مسئول:

درمان بیماری‌هایی همچون دیابت، ضعف اعصاب و سیستم گوارش استفاده می‌شود (۱۴ و ۴۷).

سالانه ۱۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی جهان در اثر شوری حاصل از آبیاری و به دلیل شوری ثانویه ناشی از فعالیت‌های بشر از چرخه تولید خارج و به زمین‌های غیرقابل کاشت تبدیل می‌شوند. در قاره آسیا بعد از روسیه، چین، هندوستان و پاکستان بیشترین سطح زمین‌های کشاورزی متأثر از تنش شوری به ایران تعلق دارد (۳۲). در ایران بخش قابل توجهی از کشور دارای خاک‌های شور و یا آب با EC بالاتر از استاندارد می‌باشد. وسعت اراضی شور ایران براساس آمار منابع مختلف بین ۲۳-۳۴ میلیون هکتار برآورد شده است (۲۰). قرار گرفتن ایران در بخشی از کره زمین که نزولات جوی در بسیاری از مناطق آن، نیاز آبی گیاهان را تأمین نمی‌نماید، مشکل تنش شوری را تشدید نموده است (۳۲). شوری خاک در ایران پس از کم آبی مهمترین عامل محدود کننده رشد و موجب تنش می‌باشد. شوری خاک دامنه گسترده‌ای از اختلالات را در سلول‌های گیاه ایجاد می‌کند که عمدتاً به دلیل تجمع آنیون و کاتیون‌های Cl^- و Na^+ می‌باشد (۱۳). کاهش فعالیت فتوسنتزی گیاه در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی، کاهش آماس سلولی، کاهش سطح برگ و در نتیجه کاهش رشد و عملکرد اقتصادی از اثرات تنش شوری بر گیاهان است (۴۴). تحقیقات نشان داده است که تنش شوری در سطح مولکولی موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو در سلول می‌گردد. تنش‌های اکسیداتیو نیز به نوبه خود موجب آسیب به سلول‌ها و نهایتاً مرگ آن‌ها و در نتیجه مرگ کل گیاه می‌گردد (۲۴).

طبق بررسی‌های صورت گرفته، مطالعات کمی در خصوص تنش‌های غیر زیستی در گیاه قرنفل صورت گرفته و هیچ مطالعه‌ای درخصوص تنش شوری در محیط درون شیشه‌ای بر روی پنبه گیاه قرنفل نیز به مشاهده نگردیده است. هاولا و جزیری (۳۶) در پژوهشی بر روی گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus*) به بررسی تأثیر سطوح مختلف نمک کلرید سدیم اضافه شده به میخک کشت MS در محیط درون شیشه‌ای پرداختند. آن‌ها دریافتند که اعمال تنش شوری موجب کاهش ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها در ارقام کریمسون تمپو (Crimson Tempo) و یلو لیبرتی (Yellow Liberty) و در نتیجه کاهش رشد رویشی شاخساره‌های میخک در محیط درون شیشه‌ای می‌گردد. میزان تحمل ارقام مذکور به کلرید سدیم نیز متفاوت بود، به نحوی که آستانه تحمل کلرید سدیم و عدم کاهش رشد در رقم کریمسون تمپو در غلظت ۱۰۰ میلی مولار و در رقم یلو لیبرتی در غلظت ۵۰ میلی مولار بود. سوندراجان و همکاران (۵۵) در پژوهشی دیگر بر روی گیاه میخک رقم تول (Tula) به بررسی تأثیر سیلیکون بر تنش شوری ناشی از اضافه نمودن کلرید سدیم به محیط کشت در محیط درون شیشه‌ای پرداختند. آن‌ها مشاهده نمودند که تنش شوری موجب کاهش رشد، افت فتوسنتز و کاهش کلروفیل

(a و b کل) در میخک استقرار یافته در محیط درون شیشه‌ای می‌گردد. تنش شوری همچنین موجب افزایش تنش اکسیداتیو در میخک گردید که به طور موفقیت آمیزی توسط کاربرد سیلیکون کنترل گردید. به طور کلی فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت. به نحوی که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز، پراکسیداز و گوایکول پراکسیداز با افزایش سطح تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت، این درحالی بود که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. ما و همکاران (۳۷) در پژوهشی اقدام به بررسی تأثیر تنش شوری بر گیاه میخک بنفش (*Dianthus L. superbus*) و همچنین مکانیزم کاهش اثرات منفی تنش توسط استفاده از اسید سالیسیلیک پرداختند. آن‌ها دریافتند با افزایش تنش شوری، میزان تخریب لیپیدهای غشاء سلولی افزایش می‌یابد، درحالی که همزمان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون سوپراکسیددسموتاز افزایش می‌یابد.

نیسیرین و همکاران (۴۵) در پژوهشی درون شیشه‌ای بر روی گیاه میخک دریافتند که مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم در مقاومت گیاه به تنش شوری باعث افزایش میزان پروتئین گیاه می‌گردد. عزیزی و همکاران (۱۰) در تحقیقی بر روی گیاه قرنفل از نمک‌های $NaCl$ و $CaCl_2$ در سطوح ۰، ۲، ۴ و ۶ دسی‌زیمنس بر متر در جهت اعمال تنش استفاده نمودند. آن‌ها دریافتند که در سطح تنش شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر کلرید سدیم میزان جوانه‌زنی و رشد گیاه کاهش می‌یابد. در پژوهشی رستمی و مظاهری (۵۱) به منظور بررسی میزان مقاومت گیاه قرنفل به تنش شوری کلرید سدیم، گیاهان را در معرض کلرید سدیم با غلظت‌های صفر، ۴، ۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر قرار دادند. آن‌ها دریافتند که اعمال تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر باعث کاهش جوانه‌زنی میزان ۴۰ درصد در مقایسه با تیمار شاهد و در تیمار شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر، به میزان ۳۳ درصد گردید.

مطالعات پایه بر روی مقاومت به تنش شوری از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اهمیت بسیاری دارد. باتوجه به اینکه کشت بافت و پنبه یکی از مهمترین تکنیک‌ها در به‌نژادی مدرن گیاهان می‌باشد، تحقیق بر روی مکانیزم‌های تنش شوری در محیط درون شیشه‌ای اهمیت ویژه‌ای در مطالعات مرتبط با تنش دارد. در تحقیق حاضر باتوجه به اهمیت گیاه قرنفل در فضای سبز مناطق کم آب، تأثیر سطوح مختلف تنش شوری توسط کلرید سدیم بر برخی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پنبه‌های استقرار یافته گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش پیش رو تأثیر تنش شوری بر پنبه‌های گیاه قرنفل از

دو جنبه فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد گیاهی

بذر گیاه قرنفل (*Dianthus barbatus* L.) جهت دستیابی به پینه گیاه قرنفل به منظور اعمال تنش شوری، از شرکت پارمیس بذر (اصفهان، ایران) تهیه گردید. در ابتدا اقدام به استقرار گیاهان استریل به صورت دانهال در محیط درون شیشه‌ای جهت دستیابی به ریزنمونه‌های مختلف استریل گردید. بدین منظور، در مرحله اول بذرهای با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در زیر هود لامینار ضد عفونی سطحی و سپس به مدت ۶۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار داده شده و نهایتاً دوبار با آب مقطر دو بار تقطیر استریل شستشو داده شدند. بذرهای استریل شده در درون ظروف کشت شیشه‌ای با قطر ۱۰ سانتی متر و ارتفاع ۲۰ سانتی متر که حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MS پایه (بدون هورمون) با غلظت ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز که pH آن بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم گردیده بودند، کشت گردیدند. بذرهای کشت شده فوق‌الذکر جهت رسیدن به اندازه مناسب برای استحصال ریزنمونه استریل، به مدت ۴ هفته درون دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند.

استقرار پینه

استقرار پینه گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای از گیاهان استریل مطابق روش پیشنهادی توسط مشعشی و همکاران (۴۲) و با کشت ریزنمونه‌های مختلف برگ، ساقه و ریشه بر روی محیط کشت MS غنی شده با سطوح مختلف هورمون‌های بنزیل آمینوپورین (BAP) (۲ و ۴ میکرومولار)، نفتالین استیک اسید (NAA) (۴ و ۶ میکرومولار) و 2,4-D (۴ و ۶ میکرومولار) صورت گرفت. پینه‌های حاصل از روش مذکور جهت پرآوری بر روی محیط کشت MS غنی شده با ۲ میکرومولار بنزیل آمینوپورین و ۶ میکرومولار نفتالین استیک اسید که مناسبترین ترکیب هورمونی جهت پینه‌زایی معرفی شده بود، کشت و چندین مرتبه تا حصول حجم مناسبی از پینه جهت اعمال تنش، واکشت گردیدند.

تأثیر تنش بر پینه‌های گیاه قرنفل

به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر پینه‌های گیاه قرنفل، پینه‌های پرآوری شده در مرحله قبل، بر روی محیط کشت بهینه پینه زایی فوق‌الذکر حاوی مقادیر مختلف کلرید سدیم (ساخت شرکت مرک، آلمان) به منظور اعمال تنش شوری کشت گردیدند. سطوح مختلف تنش شوری شامل شش تیمار با مقادیر ۰، ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ گرم‌درلیتر کلرید سدیم بود. شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی

پینه‌های تنش یافته در فواصل زمانی شش روزه و شاخص‌های بیوشیمیایی آن‌ها پس از گذشت ۳۰ روز از اعمال تنش مورد مطالعه قرار گرفت. شاخص‌های مورد مطالعه در پینه‌های تنش یافته از سه جنبه رشدی، مکانیزم محافظت اسمزی (Osmoprotection) و تنش اکسیداتیو (Oxidative Stress) مورد بررسی قرار گرفتند. شاخص‌های رشدی مورد مطالعه عبارت بودند از: درصد پینه‌های کلروزه و نکروزه شده، رنگ و نوع بافت پینه‌های تنش یافته، وزن تر و خشک پینه‌های تنش یافته و رشد پینه‌های تحت تنش.

میزان محتوی پروتئین کل، میزان آنزیم بتائین آلدهیددیهیدروژناز و محتوی اسملیت گلیسین-بتائین به عنوان شاخص‌های دخیل در محافظت اسمزی و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز و میزان بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص‌های دخیل در تنش اکسیداتیو در پینه‌های تنش یافته از دیگر شاخص‌های مورد مطالعه بودند.

شرایط آزمایش

جهت اعمال و بررسی آثار تنش، پینه‌های تحت تنش شوری در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۲۵ درصد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی درون دستگاه ژرمیناتور نگهداری شدند.

شاخص‌های رشدی مورد مطالعه

رشد قطری پینه

رشد قطری پینه‌های تنش یافته توسط اندازه‌گیری طول و عرض آن‌ها توسط کاغذ شطرنجی و محاسبه قطر پینه بوسیله فرمول پیشنهادی توسط کامپتون (۱۵) (فرمول ۱) در بازه‌های زمانی ۶ روزه محاسبه گردید.

$$\text{عرض} \times \text{طول} = \sqrt{\text{قطر پینه}} \quad (\text{فرمول ۱})$$

نرخ رشد نهایی پینه

در انتهای دوره تنش، قطر پینه‌ها اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول زیر نرخ رشد نهایی پینه‌ها در سطوح مختلف تنش محاسبه شد.

$$\text{نرخ رشد نهایی پینه} = \frac{D_2 - D_1}{D_1} \quad (\text{فرمول ۲})$$

D_1 : قطر پینه در ابتدای آزمایش و D_2 : قطر پینه در پایان دوره تنش

درصد پینه‌های کلروزه و نکروزه

درصد پینه‌های کلروزه و نکروزه، ۲۱ روز بعد از کشت پینه‌های تنش یافته در محیط کشت حاوی کلرید سدیم با مشاهده و اختصاص عدد ۰ تا ۱۰ (عدد صفر نمایانگر پینه سالم و عدد ۱۰ نمایانگر پینه کاملاً کلروزه و یا نکروزه) ثبت گردید.

میزان فعالیت بتائین آلدئید دهیدروژناز

استخراج آنزیم

استخراج آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز توسط روش آرکاوا و همکاران (۵) انجام پذیرفت. مطابق روش مذکور ۱۰ گرم از بافت پینه تنش یافته گیاه قرنفل در ۲۰ میلی‌لیتر بافر استخراج هموژنیزه گردید. بافر استخراج شامل ۵۰ میلی‌مولار MOPS-NaOH (با پی‌اچ ۷/۵)، ده درصد حجمی گلیسرول، یک میلی‌مولار EDTA، دو میلی‌مولار DTT و ۱۰ درصد جرم به حجم پلی‌ونیل-پلی‌پیرولیدون (Polyvinyl-Polypyrrolidone) بود. محلول استخراج هموژنیزه، ابتدا فیلتر و با دور ۴۰۰۰g برای ده دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول فوقانی به دست آمده با $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ به ۵۵ درصد اشباع رسانده و برای ۲۰ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول فوقانی حاصل مجدداً توسط $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ به ۷۰ درصد اشباع رسانده و مجدداً برای ۲۰ دقیقه دیگر با دور ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. ته‌نشین حاصل، درون بافر حاوی ۱۰ میلی‌مولار MOPS-NaOH (با پی‌اچ ۷/۵)، ده درصد وزن به حجم گلیسرول، یک میلی‌مولار EDTA، دو میلی‌مولار DTT تعلیق گردید و محلول حاصل به عنوان بتائین آلدئید دهیدروژناز خام در مرحله بعد جهت اندازه‌گیری فعالیت مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت

آزمون سنجش فعالیت آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز توسط روش فلئومتریکی توصیف شده توسط آرکاوا و همکاران (۶) انجام پذیرفت. در روش مذکور مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میلی‌مولار بافر پتاسیم-فسفات (با پی‌اچ ۸/۰)، ۰/۵ میلی‌مولار NAD^+ ، پنج میلی‌مولار DTT و ۰/۵ میلی‌مولار بتائین آلدئید بود. اندازه‌گیری فلورسانس محلول واکنش توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس مدل هیتاچی در طول موج تهییج ۳۴۰ و نشر ۴۶۰ نانومتر انجام پذیرفت. میزان فعالیت توسط نرخ ابتدایی جهت احیاء NAD^+ در میلی‌گرم پروتئین کل بیان گردید.

آماده سازی عصاره آنزیمی از پینه‌های تنش یافته

بافت گیاهی پینه‌های تنش یافته توسط ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم (با پی‌اچ ۷/۰) حاوی ۱ مولار کلرید سدیم، ۱ درصد پلی‌ونیل‌پیرولیدین و ۱ میلی‌مولار EDTA بر روی یخ هموژنیزه و خرد گردیدند. سپس با دور ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و محلول فوقانی که عصاره آنزیمی پینه‌های تنش یافته بود، جهت

وزن تر و خشک پینه

در انتهای آزمایش وزن تر پینه‌ها توسط ترازو دیجیتال با دقت یک ده هزارم گرم سنجیده و سپس همان پینه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و وزن خشک آنها توسط ترازو دیجیتال اندازه‌گیری گردید.

میزان پروتئین کل

میزان پروتئین کل پینه‌های تنش یافته به روش بردفورد (۱۲) اندازه‌گیری گردید. در این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه پینه تنش یافته در هاون چینی سرد توسط قرار دادن در ظرف یخ و اضافه نمودن ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با پی‌اچ ۶/۸) هموژن گردید. سپس محلول هموژن شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی عصاره (محلول فوقانی) به دست آمده جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول به میکروتیوپ جدید منتقل و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت اندازه‌گیری، ۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی عصاره برداشته و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کوماسی آبی جی-۲۵۰ به آن اضافه کرده و پس از مخلوط نمودن توسط ورتکس، جذب نور توسط نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه طیف سنج یو-وی-مرئی قرائت گردید.

میزان گلاسلین-بتائین

میزان گلاسلین-بتائین (Glycine-Betaine) توسط روش گریو و گراتن (۲۶) با کمی تغییرات اندازه‌گیری گردید. بدین منظور پینه‌های تنش یافته را ابتدا خشک نموده، کاملاً پودر کرده و میزان ۰/۵ گرم از آن را درون ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و برای ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده تا به هم زده شوند. سپس عصاره به دست آمده در محلول ۲ نرمال اسید سولفوریک با نسبت مساوی ۱:۱ حل گردید. مقادیر ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ذکر شده درون لوله آزمایش ریخته و برای یک ساعت بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر عامل واکنش KI-I_2 به آن اضافه نموده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری گردید. بعد از سپری شدن مدت مذکور، محلول واکنش را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده

به میزان آنزیم مورد نیاز برای بازدارندگی ۵۰ درصد فعالیت کاهنده نیتروبلوتترازولیوم در دقیقه تعریف گردید.

میزان بیومارکر تخریبی مالون دی آلدئید

برای سنجش مالون دی آلدئید طبق روش بومیناتان و دوران (۱۱) با استفاده از عصاره پینه‌های برگ در محلول ۰/۱ درصد (W/V) تری کلرواستیک اسید استخراج شده و به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به نسبت ۱ به ۴ از محلول فاز بالایی با ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله‌های آزمایش بلافاصله در یخ سرد شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. همزمان با عصاره‌های پینه، محلول استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ میکرومول از ۳، ۱ و ۱- تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانو متر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند.

طرح آزمایش و واکاوی آماری

در این پژوهش از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (شامل ۶ سطح تنش در ۵ تکرار) استفاده گردید. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS 16.0 مورد واکاوی آماری (تجزیه واریانس) قرار گرفت. میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

رشد پینه‌های تنش یافته

تنش شوری توسط کلرید سدیم، رشد پینه‌های گیاه قرنفل را تحت تأثیر قرار داد و موجب کاهش رشد پینه‌های گیاه قرنفل گردید. میزان رشد پینه‌ها با سطح تنش (افزایش میزان غلظت کلرید سدیم)، همبستگی منفی داشت به نحوی که کمترین رشد در پینه‌های تنش یافته توسط ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم مشاهده گردید. این کاهش رشد در بازه زمانی بعد از گذشت ۳۰ روز از اعمال تنش شوری حتی در کمترین سطح تنش (یک گرم در لیتر) نیز، رشد پینه‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش داد. کاهش رشد به نحوی بود که رشد پینه‌ها در غلظت ۳ گرم در لیتر به نصف میزان شاهد رسید و اندازه آن‌ها در تیمار ۱۲ گرم در لیتر به نصف اندازه پینه‌ها در تیمار شاهد نیز نرسید.

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۲۰- نکه‌داری گردیدند و سپس در مرحله اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

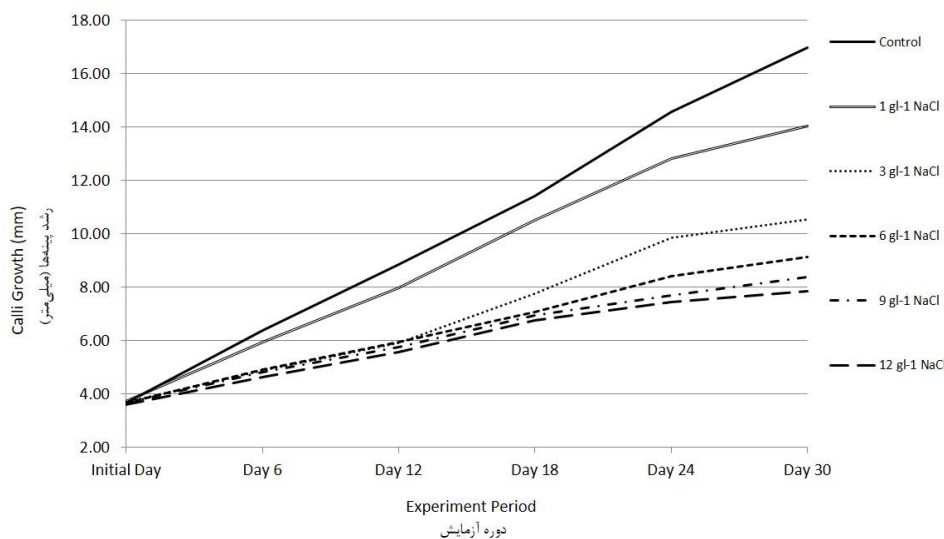
میزان فعالیت آنزیم کاتالاز توسط مصرف پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه توسط روش آبی (۱) با کمی تغییرات به کمک دستگاه طیف سنج یو-وی-مرئی اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (با pH=۷/۰)، ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی‌لیتر عصاره گیاهی (تهیه شده در مرحله فوق‌الذکر) و رساندن به حجم ۳ میلی‌لیتر بود. میزان فعالیت برحسب مقدار پراکسید هیدروژن تجزیه شده برحسب نانو مول در دقیقه محاسبه گردید.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط روش کارا و میسرا (۳۴) صورت گرفت. در این روش ابتدا مخلوط آزمایش تهیه گردید. مخلوط آزمایش که شامل ۱۲۵ میکرومولار بافر فسفات (با pH=۶/۸)، ۵۰ میکرومولار پیروگالول (Pyrogallol) و ۵۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن بود را ابتدا تهیه و سپس یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی پینه‌های تنش یافته به آن اضافه گردید. سپس مخلوط آزمایش تهیه شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت واکنش نکه‌داری شد. بعد از گذشت مدت مذکور، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک با نسبت حجمی ۵ درصد جهت متوقف شدن آزمایش به آن اضافه گردید. میزان پورپوروگالین (Purpurogallin) تشکیل شده توسط قرائت میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه طیف سنج یو-وی-مرئی مشخص گردید.

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز بر اساس روش مینامی و یوشیکاوا (۴۰) توسط بافر نمک تریس کلسیم کدلیک (Tris-Ca-) (Codylic) (با pH=۸/۲) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA توسط دستگاه طیف‌سنج یو-وی-مرئی در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش حاوی ۱/۴۲ درصد تریتون x-۱۰۰ (Triton 100-x)، ۰/۵۵ میلی‌مولار نیتروبلوتترازولیوم (nitroblue tetrazolium) (NBT)، ۱۶ میلی‌مولار پیروگالول و عصاره آنزیمی حاوی ۵۰ میلی‌گرم پروتئین بود. واحد فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز (SOD) طبق تعریف مک‌کورد و فریدوویچ (۳۹)



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر رشد پینه‌های گیاه قرنفل در محیط درون شیشه‌ای
Figure 1- Effect of different levels of salinity stress on calli growth in *Dianthus barbatus*

وزن تر و خشک پینه‌های تنش یافته

همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، وزن تر پینه‌های قرنفل مانند رشد آن‌ها تحت تأثیر تنش شوری توسط کلرید سدیم قرار گرفت و با اعمال تنش شوری، مقدار آن به طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش برای وزن خشک به نحوی بود که در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به حداقل خود و کمتر از نصف در تیمار شاهد به میزان ۰/۲۸ گرم رسید. وزن خشک پینه‌ها نیز همانند وزن تر با افزایش سطح تنش شوری، کاهش یافت (جدول ۱). میزان کاهش وزن خشک نیز همانند رشد و وزن تر در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به کمتر از نصف مقدار آن در تیمار شاهد به میزان مقدار ۰/۰۰۸ گرم رسید.

نرخ رشد نهایی پینه‌های تنش یافته

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، نرخ رشد نهایی پینه‌های گیاه قرنفل با افزایش میزان کلرید سدیم در محیط کشت (تنش شوری)، کاهش یافت. تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار نرخ رشد نهایی پینه‌ها گردید. این درحالی است که اختلاف معنی‌داری بین نرخ رشد نهایی پینه‌ها در سطوح مختلف کلرید سدیم مشاهده نگردید.

کلروزه و نکروزه شدن پینه‌های تنش یافته

در این آزمایش علی‌رغم اعمال تنش شوری، پینه‌ها در هیچ کدام از سطوح مختلف تنش کلروزه و یا نکروزه نگردیدند.

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری درون شیشه‌ای بر نرخ رشد نهایی، وزن تر و خشک پینه‌های قرنفل

Table 1- Effect of different levels of salinity stress on final growth rate, fresh weight and dry weight of *Dianthus barbatus* calli

تنش شوری	وزن تر	وزن خشک	نرخ رشد نهایی
Salt stress treatment (g l ⁻¹ NaCl)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Final growth rate (mm)
0 (control)	0.77 a	0.018 a	0.61 a [†]
1	0.66 b	0.017 a	0.31 b
3	0.45 b	0.011 b	0.10 bc
6	0.37 bc	0.011 b	0.09 bc
9	0.36 bc	0.010 b	0.08 bc
12	0.28 c	0.008 b	0.05 c

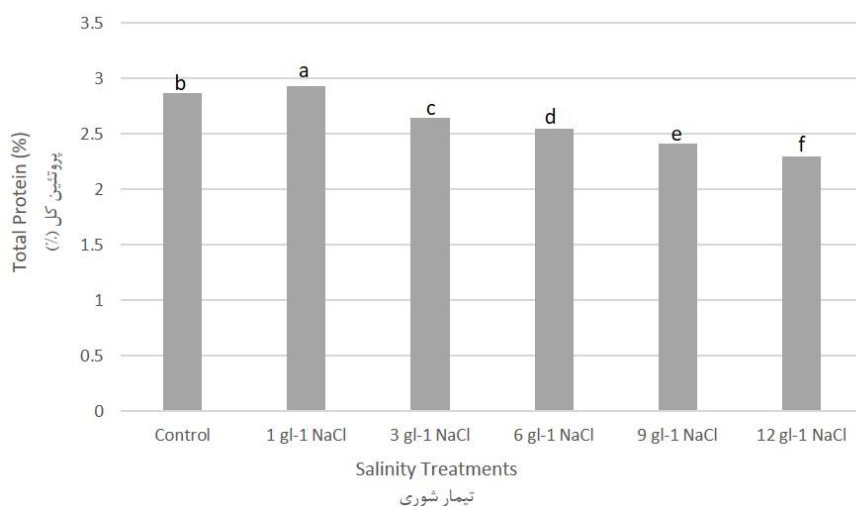
[†] میانگین‌های دارای حروف مشترک، فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

[†]The means with common alphabets are not significantly different at the 5% probability level using Duncan's multiple range test.

میزان پروتئین کل در پینه‌های تنش یافته

مقدار پروتئین کل در پینه‌های گیاه قرنفل تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت (شکل ۲). در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل،

کمترین میزان پروتئین کل در پینه‌های تیمار تنش شوری ۱۲ گرم در لیتر مشاهده گردید.



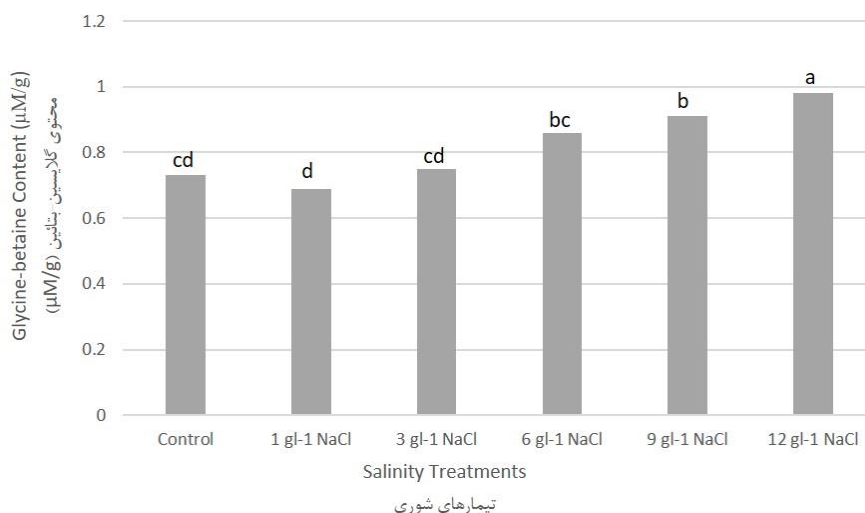
شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان پروتئین کل در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)

Figure 2- Effect of different salinity levels on total protein content in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

این اسمولیت، به میزان ۰/۹۸ میکرومول بر گرم در پینه‌ای تنش یافته تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم مشاهده گردید. گلايسين-بتائين معمول‌ترین و فراوان‌ترین نوع بتائين در گیاهان است که از اتصال دو اسید آمینه گلايسين و بتائين در شرایط تنش و از سنتز پروتئین‌ها بدست می‌آید. افزایش میزان اسمولیت گلايسين-بتائين تحت تنش شوری در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (۲۵).

میزان اسمولیت گلايسين-بتائين در پینه‌های تنش یافته

میزان اسمولیت گلايسين-بتائين نیز متأثر از تنش شوری گردید. در ابتدا با افزایش میزان کلرید سدیم به میزان ۱ گرم در لیتر، میزان گلايسين-بتائين مقدار کم و غیر معنی‌دار کاهش و سپس با افزایش بیشتر میزان کلرید سدیم و در نتیجه تنش شوری، میزان اسمولیت گلايسين-بتائين افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۳). بیشترین میزان



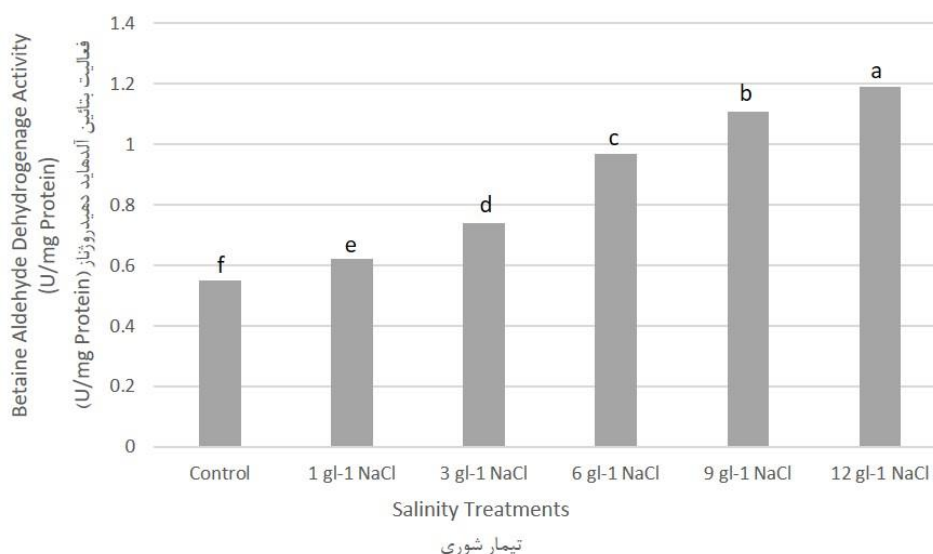
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان اسمولیت گلايسين-بتائين در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)

Figure 3- Effect of different salinity levels on glycine-betaine content in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

میزان بتائین آلدهاید دهیدروژناز در پینه‌های تنش یافته

میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز با افزایش تنش شوری در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان افزایش در فعالیت آنزیم مذکور با افزایش سطح تنش افزایش یافت به نحوی که میزان فعالیت این آنزیم در پینه‌های تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم تقریباً دو برابر میزان آن در پینه‌های تنش یافته تیمار ۱ گرم در لیتر بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهاید دهیدروژناز در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به

میزان ۱/۱۹ واحد بر میلی گرم پروتئین و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد به میزان ۰/۵۵ واحد بر میلی گرم پروتئین مشاهده گردید (شکل ۴). از آنجایی که این آنزیم در سنتز اسمولیت گلايسين-بتائين نقش کلیدی دارد (۵)، افزایش فعالیت آن با میزان تجمع اسمولیت گلايسين-بتائين در پینه‌های تنش یافته همخوانی دارد. نتایج تجزیه همبستگی (جدول ۲) نیز نشان دهنده همبستگی معنی‌دار میزان اسمولیت گلايسين-بتائين با میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز به میزان ۰/۹۷۲ درصد می‌باشد.



شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم بتائین آلدهاید دهیدروژناز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)

Figure 4- Effect of different salinity levels on betaine aldehyde dehydrogenase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

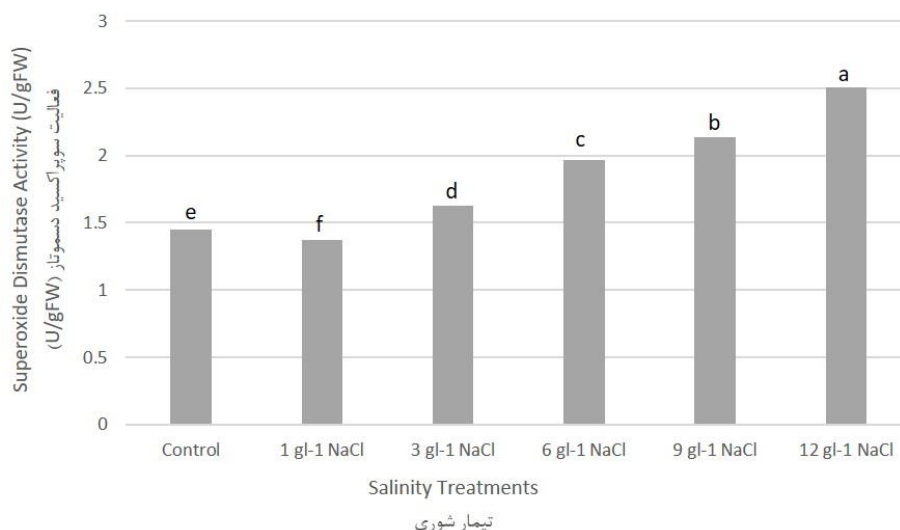
میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پینه‌های

تنش یافته

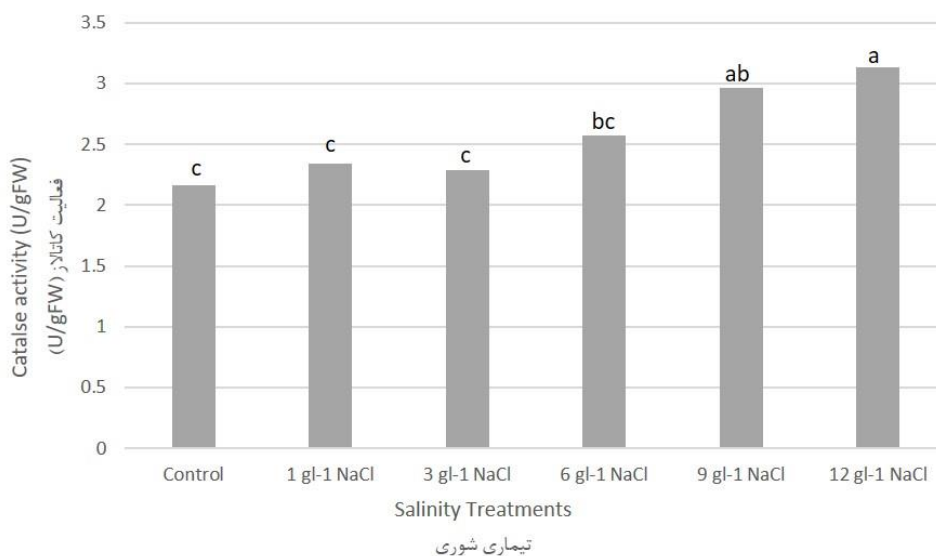
میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پینه‌های گیاه قرنفل تحت تأثیر تنش شوری افزایش یافت. در پینه‌های تحت تنش میزان فعالیت این آنزیم ابتدا در غلظت ۱ گرم در لیتر کلرید سدیم کاهش جزئی غیر معنی‌دار و سپس با افزایش سطح تنش، افزایش معنی‌دار یافت به نحوی که پینه‌های تیمار ۱۲ گرم در لیتر بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز به میزان ۲/۵۱ واحد در گرم وزن تر را به خود اختصاص داده و کمترین میزان فعالیت آن نیز در پینه‌های تیمار شاهد به میزان ۱/۴۵ واحد در گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۵). بیشترین میزان افزایش این آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد ۱/۰۶ واحد بود.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه‌های تنش یافته

فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل همانند فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز با تنش شوری افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به میزان ۳/۱۳ واحد در گرم وزن تر و کمترین مقدار فعالیت آن در تیمار شاهد به میزان ۲/۱۶ واحد در گرم وزن تر مشاهده شد. اگرچه بیشترین میزان افزایش فعالیت کاتالاز در مقایسه با شاهد به میزان ۰/۹۷ واحد مشاهده گردید، لیکن به طور کلی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با سوپراکسید دسموتاز تحت شرایط تنش شوری در پینه‌های گیاه قرنفل بیشتر بود (شکل ۶).



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
Figure 5- Effect of different salinity levels on superoxide dismutase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)



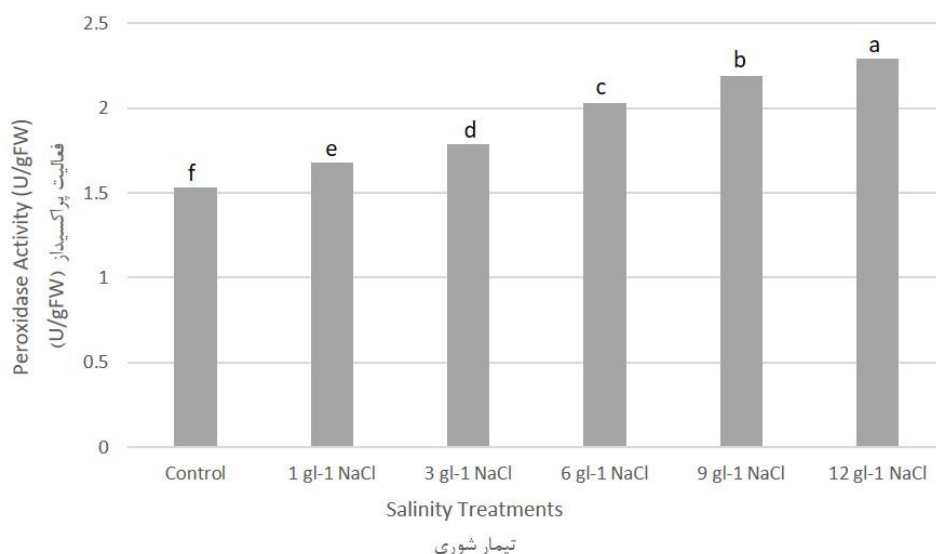
شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
Figure 6- Effect of different salinity levels on catalase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

میزان مالون‌دی‌آلدهاید در پینه‌های تنش یافته

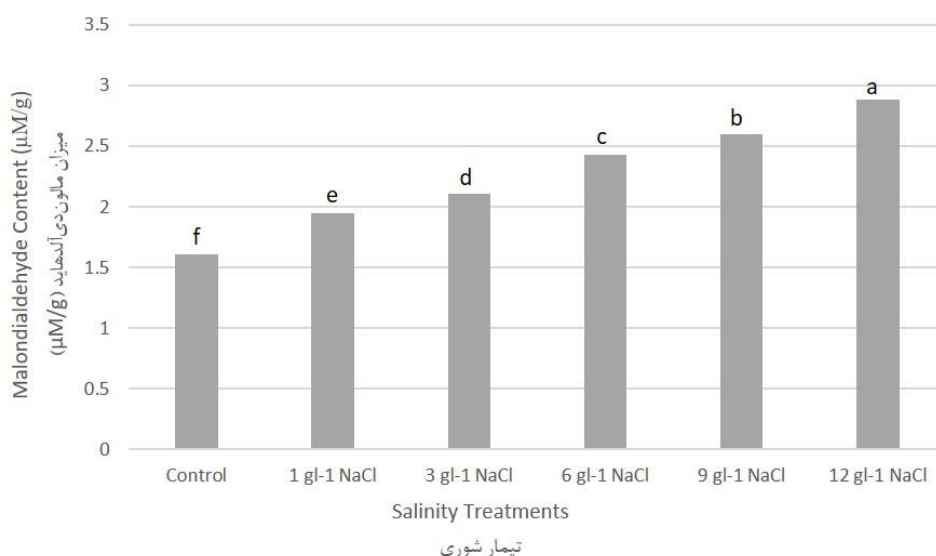
در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل، میزان مالون‌دی‌آلدهاید در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۸). روند افزایشی به نحوی بود که با افزایش سطح تنش این مقدار نسبت به تیمار شاهد ۱/۲۷ میکرومول بر گرم افزایش یافت. بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهاید در پینه‌های تنش یافته تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به میزان ۲/۸۸ میکرومول بر گرم و کمترین میزان آن در تیمار شاهد به میزان ۱/۶۱ میکرومول بر گرم مشاهده گردید. افزایش مالون‌دی‌آلدهاید تحت تنش شوری در گیاهان مختلفی گزارش شده است (۱۷، ۱۹ و ۲۴).

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پینه‌های تنش یافته

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز مانند آنزیم‌های دیگر شکار کننده رادیکال آزاد مورد مطالعه (سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز) با اعمال تنش شوری، افزایش یافت (شکل ۷). بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در تیمار ۱۲ گرم در لیتر کلرید سدیم به میزان ۱/۱۲ واحد در گرم وزن تر و کمترین مقدار فعالیت آن در تیمار شاهد به میزان ۰/۵۵ واحد در گرم وزن تر مشاهده گردید. بیشترین میزان افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد ۰/۵۷ واحد بود که نصف میزان افزایش فعالیت دو آنزیم دیگر مورد مطالعه بود.



شکل ۷- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
Figure 7- Effect of different salinity levels on peroxidase activity in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)



شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف تنش شوری بر میزان مالون‌دی‌آلدهاید پینه‌های قرنفل ($P \leq 0.05$)
Figure 8- Effect of different salinity levels on malondialdehyde content in *Dianthus barbatus* calli (DMRT, $P \leq 0.05$)

تغییر سطح فعالیت آنها با میزان فعالیت آنها در شاهد تفاوت‌هایی وجود دارد، لیکن افزایش فعالیت آنها در نتیجه تنش همبستگی قوی و ارتباط مستقیمی با میزان تخریب لیپیدها داشت. در بین آنزیم‌های مورد مطالعه، بیشترین ضریب همبستگی بین به میزان ۹۶/۷ درصد در پراکسیداز و کمترین میزان ۹۵/۰ درصد در سوپراکسید دسموتاز مشاهده گردید.

نقش آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد در تخریب لیپید در پینه‌های تنش یافته

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، آزمون همبستگی بین فعالیت آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد همچون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز با بیومارکر تخریبی مالون‌دی‌آلدهاید که در نتیجه تخریب لیپیدهای غشاء به وجود می‌آید، همسو و مثبت می‌باشد. اگرچه بین میزان فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و همچنین

جدول ۲- همبستگی فعالیت آنزیم‌های مختلف مورد مطالعه و محصولات مرتبط با فعالیت آن‌ها

Table 2- Correlation analysis between the activity of different studied enzymes and their related products

	Superoxide Dismutase سوپراکسید دسموتاز	Catalase کاتالاز	Peroxidase پراکسیداز	Glycine-Betain گلایسین-بتائین
Malondialdehyde مالون‌دی‌آلدهید	0.950 **	0.951 **	0.967**	Betaine Aldehyde Dehydrogenase بتائین آلدی‌دهیدروژناز

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون.

** Significantly correlated at 0.01 probability level by Pearson Correlation Test.

بحث

کاهش رشد پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل با یافته‌های ساکتیولو و همکاران (۵۲)، الخیری و البحرانی (۴) و لوتوس و همکاران (۳۶) و همچنین سونداراجان و همکاران (۵۵) که گزارش نموده‌اند با افزایش سطح تنش (شوری و خشکی) میزان رشد کم می‌شود، مطابق می‌باشد. کاهش رشد در هنگام مواجهه به تنش شوری به دلیل برهم‌خوردن هومئوستازی پتانسیل آب در بافت درحال رشد می‌باشد که با نتایج داش و پاندا (۱۶) همسو است.

تنش شوری ضمن تأثیر منفی بر رشد پینه و کاهش رشد آن، موجب کاهش وزن پینه‌ها در محیط درون شیشه‌ای نیز می‌گردد. درحقیقت یکی از اثرات تنش شوری در گیاهان کاهش فعالیت فتوسنتزی آن‌ها است که موجب کاهش جذب CO_2 و به دنبال آن میزان رشد و وزن گیاه نیز کم می‌شود (۳۳). در پژوهشی سلمالیان و همکاران (۵۳) با بررسی تنش شوری بر روی ریزنمونه‌های گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، آنها دریافتند که وزن تر و خشک پینه‌های گیاه استویا به طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرند. به طور مشابه‌ای، آنها نیز مشاهده نمودند که در تیمار ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، وزن تر و خشک پینه‌ها به طور معنی‌داری کمتر از شاهد و به ترتیب به میزان $0.2/0$ و $0.26/0$ گرم بود. آن‌ها دلیل کاهش وزن تر و خشک پینه‌ها را عامل تنش شوری و تأثیر کلرید سدیم بر روی بخش‌های مختلف به ویژه سیستم آنزیمی و کاهش فشار تورژسانس ذکر نمودند. نیسرین و همکاران (۴۵) که پینه‌های گیاه میخک را تحت تأثیر تنش شوری قرار دادند، نیز همانند پژوهش پیش‌رو دریافتند که با افزایش میزان غلظت کلرید سدیم رشد پینه‌ها تا حد بسیار زیادی کاهش می‌یابد. همچنین رضوی‌زاده (۵۰) با اعمال تنش اسمزی بر روی پینه‌های حاصل از گل میخک دریافتند که با افزایش تنش (غلظت پلی اتیلن گلیکول) میزان رشد پینه‌ها به تدریج کاهش پیدا می‌کند و در غلظت‌های ۲۰ درصد و ۳۰ درصد رشد پینه‌ها به میزان زیادی کاهش می‌یابد. کاهش رشد پینه در گیاهان مختلف خانواده میخک تحت تنش نیز

توسط محققین مختلف گزارش شده است. آیسه و علی‌کمان‌آغلو (۹)، هاولا و جزیری (۲۸)، هاولا و همکاران (۲۹)، سونیتا و گوپتا (۵۷) و تهرانی‌فر و خرازی (۵۹) در مطالعات خود پینه‌های گیاه میخک را در محیط درون شیشه‌ای تحت تأثیر تنش خشکی قرار داده بودند نیز دریافتند تنش کیفیت و رشد پینه را تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش وزن آن می‌گردد. کاهش رشد سلول در شرایط تنش شوری می‌تواند به دلایل متعددی باشد که از جمله مهمترین آن‌ها کاهش فشار تورژسانس سلول‌ها، جمع شدن و چروکیدگی آن‌ها، عدم انبساط دیواره سلولی و توقف تقسیم سلولی در پینه‌ها باشد (۴۶ و ۴۸).

همچنین از سوی دیگر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که میزان پروتئین بافت گیاهی تحت تأثیر سطوح مختلف تنش می‌تواند تغییر کند. در پژوهشی تاکاهاشی و همکاران (۵۸) ریزنمونه‌های میخک رقم "سوئیت ویلیام" (*Sweet William*) را بر روی محیط کشت حاوی NAA و 2,4-D مستقر نموده و تغییرات بیوسنتزی پروتئین را توسط تیمار آن‌ها با کلرید سدیم بررسی کردند. آنها مشاهده نمودند که تیمار شوری موجب جلوگیری از ساخت پروتئین شده و در نتیجه مقدار پروتئین‌های موجود در پینه‌های تنش یافته در پاسخ به شوری کاهش می‌یابد. یکی از فرآیندهای مهم درون سلولی، سنتز پروتئین است که شدیداً تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد. سوتیروپولوس (۵۴) گزارش نمودند که بسیاری از پروتئین‌ها طی تنش هیدرولیز می‌شوند و بر همین اساس، کاهش در غلظت پروتئین کل، می‌تواند از نتایج تنش باشد. تنش شوری علاوه بر کاهش میزان پروتئین، با تغییر در ساختمان پروتئین‌ها می‌تواند موجب کاهش فعالیت بسیاری از آنزیم‌های موجود در گیاهان شود (۶۰). تنش شوری موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد شده که آنها نیز موجب تخریب آمینواسیدها می‌شوند (۴۶ و ۴۸).

یکی از مکانیزم‌های متداول در گیاهان جهت مقابله با تنش و اثرات منفی آن، تجمع ترکیبات محافظت‌کننده اسمزی و یا تعدیل‌کننده اسمزی می‌باشد. مالکا و همکاران (۳۸) گزارش نمودند که بیشتر گیاهان زمانی که در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند، بدون آنکه به گیاه صدمه ای وارد گردد، مکانیزم بیوسنتز تعدیل‌کننده‌های

اسمزی همچون گلاسیسین-بتائین (از طریق افزایش فعالیت آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز) را در سلول‌های خود فعال نموده و میزان این اسمولیت را افزایش می‌دهند. تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در سیتوسل سلول‌های گیاهی در حفظ آب درون سلولی و ایجاد مقاومت در برابر تنش وارده کمک می‌نماید. اشرف و فولاد (۷) تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین را به نحوی می‌دانند که از تجمع آن به عنوان شاخص مهم در مطالعات تنش شوری و کم آبی در گیاهان یاد نموده‌اند. از سوی دیگر، پاتاد و همکاران (۴۹) افزایش اسمولیت گلاسیسین-بتائین را در فعال سازی سیستم آنتی اکسیدانی و چرخه گلی‌اگرالات سلول‌های گیاهی مؤثر دانسته و گزارش نموده‌اند که گلاسیسین-بتائین در پایداری غشاهای سلولی و کاهش اثرات تنش اکسیداتیو نقش ایفا می‌نماید. مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان در تنش‌های مختلف مقاومت‌های متفاوتی در نتیجه تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین از خود نشان می‌دهند (۲۵). یافته‌های پژوهش حاضر در خصوص افزایش تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در بافت پینه‌های تنش یافته با یافته‌های میری و مقدم (۴۱) همخوانی دارد. زیرا تجمع اسمولیت گلاسیسین-بتائین در پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل با افزایش سطوح تنش شوری، افزایش یافت و این افزایش به نحوی در مقاومت پینه‌ها مؤثر بود که هیچ پینه‌ای کلروزه و یا نکروزه حتی در سطح تنش ۱۲ گرم در لیتر مشاهده نگردید.

آنزیم سوپراکسید دسموتاز در کاهش اکسیژن فعال در گیاهان نقش اساسی ایفاء می‌کند و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز منجر به مهار انواع اکسیژن فعال از جمله پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود که در طی تنش‌های غیرزیستی همانند شوری و خشکی ایجاد و تجمع می‌یابند (۶۳). کاتالاز نیز یکی دیگر از آنزیم‌های دخیل در کاهش تنش اکسیداتیو است که موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد و از این طریق سطح پراکسید هیدروژن را در سلول کاهش می‌دهد (۳۵). از سوی دیگر، پراکسیدازها به عنوان یک گروه بزرگ از ایزوآنزیم‌ها به دلیل داشتن گستره‌ای وسیع از نقاط ایزوالکتریک، عملکردهای متنوعی دارند که مهمترین آن در چرخه فعالیت گیاهی، شکار کننده رادیکال آزاد و کاتالیز کننده احیاء پراکسید هیدروژن می‌باشد (۸ و ۶۲).

تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که افزایش سطح تنش موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های شکار کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدانی همچون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان مختلف می‌گردد. در خصوص تنش شوری منیر و آفتاب (۴۳) نیز همانند پژوهش حاضر، در پژوهش خود بر روی نیشکر در محیط درون شیشه‌ای دریافتند که تیمار تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در پینه‌های تحت تنش می‌گردد. آنها گزارش نمودن در صورت مقاومت مناسب گیاه به

تنش، میزان فعالیت آنزیم شکار کننده رادیکال آزاد در هنگام تنش افزایش می‌یابد. از سوی دیگر در برخی تحقیقات روند تغییر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز باتوجه به مقاومت گیاه مورد مطالعه متفاوت بوده است. ابراهیمی و همکاران (۱۹) در پژوهش خود بر روی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) الگوی متفاوتی را مشاهد نمودند. آنها گزارش نمودند که تحت شرایط تنش، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز نسبت به تیمار شاهد در گیاه همیشه بهار ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. آنها دلیل این امر را تجمع بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و ناکارآمدی سیستم آنتی اکسیدانی گیاه در مواجه با آن دانستند.

به طور مشابه‌ای، سوندراجان و همکاران (۵۵) نیز در مطالعه خویش بر روی میخک رقم "تولا" مشاهده نمودند که تنش شوری در کلیه تیمارها موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز می‌گردد. ما و همکاران (۳۷) نیز همانند پژوهش‌های ذکر شده، در مطالعه خویش دریافتند با افزایش تنش شوری، میزان آنزیم سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در میخک بنفش (*Dianthus superbis*) تنها افزایش می‌یابد و روند کاهشی برای آن مشاهده نمی‌گردد. هراتی و همکاران (۱۱) نیز گزارش مشابه‌ای در خصوص آویشن دناپی (*Thymus daenensis* Celak) به چاپ رساندند مبنی بر اینکه تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در آویشن دناپی می‌گردد. احمدپور دهکردی و بلوچی (۲) نیز دریافتند تنش شوری موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به ویژه پراکسیداز در گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) می‌شود. این روند افزایشی در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مذکور در تنش‌های دیگر همچون تنش اسمزی نیز مشاهده گردیده است. مشعشی و همکاران (۴۲) نیز در مطالعه خویش بر روی پینه‌های گیاه قرنفل تحت تنش اسمزی دریافتند که با افزایش میزان تنش، بر میزان فعالیت آنزیم‌های مختلف شکار کننده رادیکال آزاد همچون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز افزوده می‌گردد.

داوژدو و همکاران (۱۷) و همچنین گونز و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که رادیکال‌های سوپراکسید ایجاد شده تحت تنش شوری باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء شده و در نتیجه میزان مالون‌دی‌آلدهاید را افزایش می‌دهد. از آنجایی که مالون‌دی‌آلدهاید محصول پراکسیداسیون اسیدلینولئیک می‌باشد، به عنوان یک شاخص مناسب برای پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، و تنش اکسیداتیو محسوب می‌شود (۶۱). همانند پژوهش حاضر، ما و همکاران (۳۷) در مطالعه‌ای که بر روی *Dianthus superbis* انجام دادند، دریافتند که میزان بیومارکر مالون‌دی‌آلدهاید در گیاهان تنش یافته با افزایش غلظت نمک، افزایش معنی‌دار می‌یابد. ابراهیمی و همکاران (۱۹) نیز در مطالعه‌ای بر روی گیاه همیشه بهار تحت تنش دریافتند که با افزایش تنش، محتوای مالون‌دی‌آلدهاید در بافت تنش یافته بیشتر

می‌گردد. به طور مشابه‌ای، قربانلی و همکاران (۲۳) نیز هنگام مطالعه زیره سبز تنش یافته با کلرید سدیم چهار هفته بعد از جوانه زدن، مشاهده نمودند با افزایش غلظت نمک، میزان مالون‌دی‌آلدهاید در بافت گیاهی افزایش می‌یابد. همانند پژوهش پیش‌رو، سودهاکار و همکاران (۵۶) نیز در توت‌های (*Morus alba* L.) تحت تنش شوری دریافتند که با افزایش تنش، مقدار مالون‌دی‌آلدهاید افزایش می‌یابد. مالون‌دی‌آلدهاید یک شاخص از پراکسیداسیون غشای سلول‌ها است و با نشت مواد از غشاء همبستگی مثبت دارد، هر چقدر میزان مالون‌دی‌آلدهاید بیشتر شود پراکسیداسیون غشاء و نشت الکترولیت‌ها از غشای سلولی زیادتر شده و در پی آن خسارت احتمالی بیشتر می‌شود. نتایج این پژوهش نیز مؤید این امر است.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر بیانگر پایین بودن آستانه تحمل پینه‌های گل قرنفل در محیط درون شیشه‌ای و در عین حال مقاومت پینه‌های گیاه قرنفل به تنش درون شیشه‌ای ناشی از شوری با کلرید سدیم می‌باشد. اگرچه به دلیل پایین بودن آستانه تحمل، رشد پینه‌های تنش یافته و وزن آنها تحت شرایط تنش شوری کاهش یافت، لیکن در هیچیک از سطوح تنش پینه‌ها کلروزه و یا نکروزه نگردیدند. از سوی دیگر مکانیزم‌های مختلف مقاومت به تنش (از جمله تولید محافظ‌های اسمزی و شکارکننده‌های رادیکال آزاد) به خوبی فعال شده و با افزایش سطح تنش به طور معنی‌داری افزایش یافتند. در مکانیزم

منابع

- 1- Aeby H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymology 105: 121-126.
- 2- Ahmadpour Dehkordi S., and Balouchi H.R. 2012. Effect of seed priming on antioxidant enzymes and lipids peroxidation of cell membrane in Black cumin (*Nigella sativa*) seedling under salinity and drought stress. Electronic Journal of Crop Production 5(4): 63-85. (In Persian with English Abstract)
- 3- Ali A., Afrasiab H., Naz S., Rauf M., and Iqbal J. 2008. An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Pakistan Journal of Botany 40: 111-121.
- 4- Al-Khayre K.M., and Al-Bahranny A.M. 2002. Growth, water Content, and proline accumulation in drought stressed callus of date palm. Biological Plantrum 48(1): 105-108.
- 5- Arakawa K., Katayama M., and Takabe T. 1990. Levels of Betaine and Betaine Aldehyde Dehydrogenase Activity in the Green Leaves, and Etiolated Leaves and Roots of Barley. Plant Cell Physiology, 31(6):797-803.
- 6- Arakawa K., Takabe T., Sugiyama T., and Akazawa T. 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. Journal of Biochemistry 101: 1485-1488.
- 7- Ashraf M., and Foolad M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.
- 8- Ashraf, M., and Harris, P.J.C. 2004. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants. Plant Science 166: 3-16.
- 9- Ayse S., and Alikamanoglu S. 2013. Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue culture. In Vitro Cell Developmental Biology Plant 49: 396-404.
- 10- Azizi M., Chehraz M., and Zahedi S.M. 2011. Effects of Salinity Stress on Germination and Early Growth of Sweet William (*Dianthus barbatus*). Asian Journal of Agricultural Sciences 3(6): 453-458.
- 11- Boominathan R., and Doran P.M. 2002. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist 156: 202-205.

اسمپروتکشن (osmoprotection) علاوه بر افزایش میزان پروتئین کل در نتیجه تنش، میزان فعالیت آنزیم بتائین آلداهید دهیدروژناز با افزایش میزان تنش، افزایش یافت. این امر موجب افزایش میزان محتوی گلاسن-بتائین به طور معنی‌داری در پینه‌های تنش یافته گردید. در مکانیزم محافظتی آنتی‌اکسیدانتی، میزان فعالیت‌های آنزیم‌های شکارکننده رادیکال آزاد (سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) با افزایش میزان تنش به طور معنی‌داری افزایش یافت. لیکن از سوی دیگر میزان تخریب لیپیدهای غشاء (که مالون‌دی‌آلدهاید به عنوان یک بیومارکر مشخص کننده میزان تخریب آن می‌باشد) در نتیجه تنش افزایش یافت. این امر نشان دهنده میزان تنش شدید وارده به پینه‌ها می‌باشد. با در نظر گرفتن جنبه‌ها و پاسخ‌های متفاوت پینه‌های تنش یافته گیاه قرنفل به تنش شوری، به نظر می‌رسد علیرغم وارد شدن تنش شدید به پینه‌ها، مکانیزم‌های دخیل در مقاومت به تنش در این گیاه به خوبی عمل نمودند و اگرچه تنش، موجب کاهش رشد گردید، ولی مکانیزم‌های محافظت اسمزی و آنتی‌اکسیدانی از مرگ و زوال پینه‌ها جلوگیری به عمل آوردند.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی انجمن علمی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه می‌باشد. بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه جهت حمایت مالی و معنوی این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

- 12- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 13- Cai X., Niu G., Starman T. and Hall C. 2014. Response of six garden roses (*Rosa × hybrida* L.) to salt stress. *Scientia Horticulturae* 168: 27-32.
- 14- Chandra S., and Rawat D.S. 2015. Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties. *Integrative Medicine Research* 4: 123-131.
- 15- Compton M.E. 1994. Statistical method suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tissue* 37: 217-242.
- 16- Dash M., and Panda S.K. 2001. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germination *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia Plantarum* 44(4): 587-589.
- 17- de Azevedo-Neto A.D., Prisco J.T., Enéas-Filho J., de Abreu C.E.B., and Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56(1): 87-94.
- 18- Doel J.M., and Wilkins H.F. 1999. *Floriculture: principles and species*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, USA. 613p.
- 19- Ebrahimi M., Zamani G.R., and Alizadeh Z. 2017. A study on the effects of water deficit on physiological and yield-related traits of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 33(3): 492-508. (In Persian with English Abstract)
- 20- FAO. 2010. Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. Available on URL: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spuch/topic4.htm>.
- 21- Galbally J., and Galbally E. 1997. *Carnations and Pinks for garden and greenhouse*. Timber Press, Portland Oregon, USA. 310p.
- 22- Ghasemi Ghasareh M. and Kafi M. 2015. *Floriculture: Principles and Practicals*. Elm Afarin Publication, Esfahan, Iran. 313p.
- 23- Ghorbanli M., Ahmadi F., Monfared A., and Bakhshi Khaniki G.H. 2012. Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L. four weeks after germination. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28(1): 14-27. (In Persian with English Abstract)
- 24- Gill S.S., and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930.
- 25- Giri J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11):1746-1751.
- 26- Grieve C.M., and Grattan S.R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70: 303-307.
- 27- Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci E.G., and Cicek N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164: 728-736.
- 28- Haouala F., and Jaziri F. 2009. *In Vitro* Propagation of Carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) Under Salt Stress. *Pakistan Journal of Biotechnology* 6(1-2): 27-30.
- 29- Haouala F., Hannachi C., and Zid E. 2003. Exploitation de la variabilité soma-clonale pour la recherche d'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) tolérant à la salinité. *Tropicultura* 21(1): 16-21.
- 30- Harati E., Kashefi B., and Matinzadeh M. 2017. Investigation of Reducing Detrimental Effects of Salt Stress on Morphological and Physiological Traits of (*Thymus daenensis* Celak.) through Salicylic Acid Application. *Plant Production Technology* 8(2): 111-125. (In Persian with English Abstract)
- 31- Hashemi Esfahani S.A. 2008. *Modern Floriculture Extension*. Sepehr Publication, Tehran, Iran. 192 p. (In Persian)
- 32- ICARDA. 2002. International cooperation Highlands regional program. Available on: URL: <http://www.icarda.cgiar.org>.
- 33- Irma T., Jolan C., Gabriella S., Ferenc H., Attila P., Gabriella K., Agnes S., Margit S., and Laszlo E. 2002. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre- treatment. *Acta Biologica Szegediensis* 46(3-4): 55-56.
- 34- Kar M. and Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319.
- 35- Li-Ping B., Fang-Gong S., Ti-Da G., Zhao-Hui S., Yin-Yan L., and Guang-Sheng Z. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere* 16: 326-332.
- 36- Lutts S., Almansoure M., Kinet J.M. 2004. Salinity and water stress have contrasting effects on the relation ship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Science* 167: 9-18.
- 37- Ma X., Zheng J., Zhang X., Hu Q., and Qian R. 2017. Salicylic Acid Alleviates the Adverse Effects of Salt Stress on *Dianthus superbus* (Caryophyllaceae) by Activating Photosynthesis, Protecting Morphological Structure, and Enhancing the Antioxidant System. *Frontiers in Plant Science* 8: 600

- 38-Makela P., Peltonen-Sainio P., Jokinen K., Pehu E., Setala H., Hinkkanen R., and Somersalo S. 1996. Uptake and translocation of foliar applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Science* 121: 221-230.
- 39- McCord J.M., and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244(22):6049-6055.
- 40- Minami M., and Yoshikawa H. 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinical Chemistry Acta* 92: 337-342.
- 41- Miri H.R., and Moghadam A.Z. 2015. The Effect of External Usage of Glycine Betaine on Corn (*Zea mays* L.) in Drought Condition. *Iranian Journal of Field Crops Research* 12(4): 704-717. (In Persian with English Abstract)
- 42- Moshashaei A., Jowkar M.M., and Farshadfar E. 2019. Callogenesis optimization and the effect of *in vitro* osmotic stress on *Dianthus barbatus* (L.) calli. *Journal of Plant Process and Function* 7(27): 237-252. (In Persian with English Abstract)
- 43- Munir N., and Aftab F. 2009. The role of polyethylene glycol (PEG) pretreatment in improving sugarcane's salt (NaCl) tolerance. *Turkish Journal of Botany* 33(6): 407-415.
- 44- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- 45- Nisreen Y., El-Kichaoui A., and Ayesh B. 2015. Enhancement of Salinity Tolerance in (*Dianthus caryophyllus* L.) using *in vitro* Selection Technique and Isolation of Potential Salinity Tolerance. Islamic University- Gaza Deanship of Postgraduate Studies, Faculty of Science, Department of Biological Sciences. pp: 67-87.
- 46- Orcutt D.M., and Nilsen E.T. 2000. The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons. New York, USA. pp: 177-235.
- 47- Oz Aydin S., Dirmenci T., Tumen G., and Can Baser K.H. 2006. Plants used as analgesic in the folk medicine of Turkey. *Proceedings of the 4th International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*. pp: 167-171.
- 48- Parida A.K., and Das A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- 49- Patade V.Y., Lokhande V.H., and Suprasanna P. 2014. Exogenous application of proline alleviates salt induced oxidative stress more efficiently than glycine betaine in sugarcane cultured cells. *Sugar Technology*, 16 (1): 22-29.
- 50- Razavizadeh R., and Ehsanpour A. 2004. Studying the tolerance of *Medicago sativa* L. calli to drought stress under UV-C irradiation. *Iranian Biology Journal* 17(2): 1-12. (In Persian with English Abstract)
- 51- Rostami M., and Mazaheri S. 2010. Effect of salinity stress on *Dianthus barbatus* seed germination. *Medicinal Plant National Conference*. Sari, Iran. (In Persian)
- 52- Sakthivelu G., Akitha M.K., Giridhar P., Rajasekaran T., Ravishankar G.A., Nedev T., and Kosturkova A. 2008. Drought- induced alteration in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of Soybean cultivars. *Plant Physiology* 34(1-2): 103-112.
- 53- Salmalian M., Ghasemnejad A., and Mashayekhi K. 2017. The study of quantitative and qualitative changes of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Callus under the influence of salicylic acid and salt in solid and liquid culture conditions. *Quarterly Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants* 19(3): 23-39. (In Persian with English Abstract)
- 54- Sotiropoulos T.E. 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured *in vitro*. *Biologia Plantarum* 51: 177-180.
- 55- Soundararajan P., Abinaya M., Yoo G., Park M., Sowbiya M., and Byoung R.J. 2015. Silicon Alleviates Salt stress by Modulating Antioxidant Enzyme Activities in *Dianthus caryophyllus* 'Tula'. *Environmental Biotechnology* 56(2): 233-239.
- 56- Sudhakar C., Lakshmi A., and Giridarakumar S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* 141: 613-619.
- 57- Sunita D., and Gupta A.K. 2002. Tissue culture studies in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). MS Thesis. College of Agriculture. CCS Haryana Agricultural University, Hisar, India. pp: 68-96.
- 58- Takahashi R., Liu S., and Takano T. 2009. Isolation and Characterization of Plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter Genes from Salt-Sensitive and Salt- Tolerant (Sweet William). *Journal of Plant Physiology* 166: 301- 309.
- 59- Tehranifar A., and Kharrazi M. 2016. *In Vitro* Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the Problem of Vitrification. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 5(13): 1-6.
- 60- Thakur M., and Sharma A.D. 2005. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: evidence suggesting a role of proline in seed germination. *Journal of Arid Environments* 62: 517-523.
- 61- Varier A., Vari A.K., and Dadlani M. 2010. The subcellular basis of seed priming. *Current Science* 99(4): 450-456.
- 62- Yildirim O., Aras S., and Ergul A. 2004. Response of Antioxidant System to Short-term NaCl stress in Grapevine Root stock-1616c and *Vitis vinifera* L. cv. Razaki. *Acta Biologica Cracoviensia* 46: 151-158.
- 63- Zhang F.Q., Zhang H.X., Wang G.P., Xu L.L., and Shen Z.G. 2009. Cadmium induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials* 168(1): 76-84.



Effect of *in Vitro* Salinity Stress on Growth Parameters, Osmo-protection and Oxidative Stress of *Dianthus barbatus* L. Calli

A. Moshashaei¹- M.M. Jowkar^{2*}

Received: 28-04-2019

Accepted: 05-10-2019

Introduction: *Dianthus barbatus* L. from Caryophyllaceae is an important herbaceous landscape ornamental plant in the temperate regions throughout the world. Although this ornamental plant is used as bedding plant, it also has other extensive applications such as cut flower and pot plant. Besides, in some countries the leaves of *Dianthus barbatus* are used for treatment of digestive disorders in their traditional medicine. Landscape and its quality, plays an essential role in human life. Nowadays, maintenance and development of urban landscape in many regions such as Iran is facing major challenging issues. Soil and water salinity are the most important challenges of urban landscape. Considering the challenges which landscape development faces in many parts of the country and the importance of this plant in landscape, the effect of salinity on *D. barbatus* during *in vitro* condition was studied in order to obtain some basic physiological information for future stress studies on this plant.

Materials and Methods: *In vitro* sterile plants were initially obtained from seeds by culturing them on basal MS medium. Calli were obtained by culturing leaf, stem and root explants on previously reported callogenesis optimization medium which was MS medium supplemented with 2 μ M BAP + 6 μ M NAA. Calli proliferation was then conducted on the same media. Proliferated calli with same size were subjected to MS medium supplemented with the mentioned plant growth regulators and various NaCl concentrations (0, 1, 3, 6, 9, 12 gl⁻¹) in order to induce salinity stress. Various physiological aspects and stress related mechanisms such as growth, osmo-protection and oxidative stress mechanisms were consequently studied in the stressed *Dianthus barbatus* calli. Studied growth features were calli growth, final growth rate, fresh and dry weight. Total protein content, glycine-betaine content, and the activity of betaine aldehyde dehydrogenase (BAD) were studied as a part of osmo-protection mechanism. On the other hand, the activity of free radical scavenger enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and malondialdehyde damage biomarker content were studied in stressed calli as a part of oxidative stress mechanism. Total protein was measured using Bradford method. Glycine-betaine content was measured using spectroscopy method by KI-I₂ reaction agent. The activity of betaine aldehyde dehydrogenase was evaluated using spectroscopy method by reduction with NAD⁺. SOD activity was measured using spectroscopy method and formation as an indicator. CAT activity was measured using spectroscopy method by measuring hydrogen peroxide breakdown. POX activity was measured using spectroscopy method by nitro-blue tetrazolium reduction activity. Malondialdehyde content was also measured by using spectroscopy method.

Results and Discussion: Results indicated that by increasing salinity level, calli growth and consequently fresh and dry weight reduced. Calli growth was dramatically reduced as salinity level reached above 1 gl⁻¹. This slow growth was also observed at high stress levels such as 12 gl⁻¹. By salinity increment, total protein content of the stressed calli significantly reduced. On the other hand, BAD activity increased as a result of salinity stress and consequently glycine-betaine content also increased significantly. The highest level of glycine-betaine content and also the activity of BAD activity were observed in 12gl⁻¹ NaCl treated calli. A significant correlation between glycine-betaine content and BAD activity was observed. The activity of free radical scavenger enzymes such as SOD, CAT, POX also significantly increased by salinity stress increment. The highest activity of the mentioned free radical scavenger enzymes were observed in 12 gl⁻¹ NaCl treated calli. CAT had the most activity among the mentioned studied free radical scavenger enzymes. The highest increase in POX activity was half of the control and also half of the activity increment of other studied free radical scavenger enzymes. Although the activity of free radical scavenger enzymes increased, the level of malondialdehyde damage biomarker also increased as the result of salinity stress increment. The highest amount of

1- M.Sc. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

2- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

(*- Corresponding Author Email: mjowk@iauksh.ac.ir)

malondialdehyde content was seen in the 12gl^{-1} NaCl treated calli. A significant correlation between malondialdehyde content and the activity of free radical scavenger enzymes was observed.

Conclusion: In general, the calli of *Dianthus barbatus* cultured *in vitro* are sensitive to salinity stress induced by more than 1 gl^{-1} NaCl; indicating the stress tolerance threshold. The tolerance and resistance mechanisms performed well under stress condition and the stress calli resisted to salinity up to 12 gl^{-1} NaCl and survived without chlorosis.

Keywords: Betaine aldehyde dehydrogenase, Catalase, Glycine-betaine, Malondialdehyde, Superoxide dismutase

Contents

Study of Different Organic Media on Yield Components, Quality and Quantity of Essential Oil of some Savory (<i>Satureja hortensis</i> L.) ecotypes in Gorgan	361
Kh. Hemmati- B. Ardavanpour- M. Ghazaeian- V. Akbarpour	
Study of Morphophysiological Responses of Iranian Crested Wheatgrass Genotypes (<i>Agropyron cristatum</i> L.) under Drought and Salinity Stresses	375
M.H. Sheikh Mohammadi- N. Etemadi- A. Nikbakht- M. Arab- M.M. Majidi	
The Effect of Heat Treatment and Fungicide on Controlling the Infestation of <i>Narcissus tazetta</i> L. In Vitro Culture	386
M. Kharrazi- A. Tehranifar- A. Sharifi	
Evaluation of Morphological Characteristics, Quantitative and Qualitative Yield of <i>Echium amoenum</i> as Affected by Plant Density and Application of Chemical (Urea) Fertilizer and Different Organic Fertilizers	403
M.B. Amiri- P. Rezvani Moghaddam- M. Jahan	
Optimization of Callus Production and Regeneration of <i>Zamiifolia</i> (<i>Zamioculcas zamiifolia</i>)	416
M. Sayadi Nejad- S.M. Sadeghi	
The Effect of Salicylic Acid and L-arginine on Morpho-physiological Properties and Leaf Nutrients of <i>Catharanthus roseus</i> under Drought Stress	432
M. Abaspour Esfaden- S. Kallaterjari- F. Fatehi	
Cultivation and Comparing Morphological and Phytochemical Characteristics of Seven Population of <i>Tussilago farfara</i> L. in Tehran Climate Conditions	449
M. Norani- M.T. Ebadi- M. Ayyari Noushabadi	
Effect of Drought and Salinity Stress on Growth, Flowering and Biochemical Characteristics of <i>Narsicuss tazetta</i> L.	466
A. Naseri Moghadam- H. Bayat- M.H. Aminifard- F. Moradinezhad	
Effect of Medium and Plant Growth Regulators on Micropropagation of Pepino (<i>Solanum muricatum</i> Aiton) in Vitro Condition	479
M. Aghdaei- S.H. Nemati- L. Samiei- A. Sharifi	
Study of Agromorphological Diversity, and Path Analysis of Bulb Yield and Allicin Content of Iranian Garlic Landraces under Hamedan Region	498
M.H. Alemkhoumaram- A.H. Keshtkar- A. Mirzaie Asl	
Culture Efficiency on Virus Elimination from in Vitro Shootlets of Red Flesh Apple (<i>Malus pumila</i> Mill.)	509
N. Kazemi - A.A. Habashi- W. Asadi	
Effect of Pinching, Spraying of Nitrogen and Plant Growth Regulators on Vegetative and Reproductive Characteristics of African Marigold	523
M. Zamanipour	
The Role of Ecotype, Explant and Plant Growth Regulators on Cell Suspension Culture of <i>Ferulago angulata</i> (Schlecht.) Boiss.	537
S.M. Alavi- A. Masoumiasl- N. Zare- R. Asghari Zakaria- P. Sheikhzade Mosaddegh	
The Effect of the Light-Emitting Diode Spectrum Compared to the Greenhouse Natural Light on the Quality of <i>Solenostemon escutellariodes</i> 'Wizard Scarlet' and <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> 'Scarlet Eye' Transplant	550
P. Dehkhodaei - S. Reezi- M. Ghasemei Ghehsareh	
Effect of in Vitro Salinity Stress on Growth Parameters, Osmo-protection and Oxidative Stress of <i>Dianthus barbatus</i> L. Calli	567
A. Moshashaei- M.M. Jowkar	

HORTICULTURAL SCIENCES

(AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY)

Vol. 33

No. 3

2019

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.
Arouiee, H.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Khanizadeh, S.H.	Research Scientist	Bioproducts and Bioprocesses, Agriculture and Agri-Food Canada.
Davarynejad, G.H.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Haghighi, M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Isfahan University of Technology.
Tavakkol Afshari, R.	Seed Physiology	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Azizi, M.	Medicinal Plants	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Sharifani, M.M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources.
Shoor, M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Ebadi, A.	Horticultural Sciences	Prof. Tehran University.
Fallahi, E.	Horticultural Sciences	Department of Plant Sciences, University of Idaho.
Farsi, M.	Plant Breeding and Genetics	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Kafi, M.	Floriculture and landscaping	Prof. Tehran University.
Lahouti, M.	Plant Physiology	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Zamani, Z.	Horticultural Sciences	Prof. University of Tehran, Iran

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>