نشریه علمی
علوم باغبانی
(علوم و صنایع کشاورزی)

دانشگاه فردوسی مشهد

جلد ۳۸ شماره ۳
سال ۱۴۰۳

شماره پیاپی: ۶۳

شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸

عنوان مقالات

اثر تراکم گیاه و الگوی کاشت بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیک گل لاله رقم 'Spryng' ۴۸۱
داود هاشم‌آبادی- بهزاد کاویانی- کبری شاکری کیاسرائی- رسول انسی‌نژاد- محمد رضا صفری مطلق

اثر همزیستی اندوفیت‌های *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 با دانهال‌های مکزیکن لایم تحت شرایط تنش شوری ۴۹۵
لیلا بقازاده دریایی- داود صمصام‌پور- عبدالنبی باقری- جلوه سهرابی‌پور

اثر باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر غلظت آهن، عملکرد و ترکیبات فنولیک کاهو ۵۱۱
پرستو مولائی- فاطمه نکونام- محمد بابااکبری ساری

ارزیابی اثر پایه بر میزان مقاومت برخی ارقام گلابی پیوندی به بیماری آتشک ۵۲۵
جواد صمیمی رباط- یحیی سلاح ورزی- علی تهرانی فر- ناصر بیک زاده

مطالعه مقاومت به خشکی در اکوتیپ‌های مختلف سیر بر اساس شاخص‌های تحمل در شرایط آب‌وهوایی همدان ۵۳۹
مهدی کاکایی

بررسی کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر عملکرد ریزوم و مواد مؤثره گیاه زنجبیل ۵۵۳
فائزه رضوانی نیا- محمّدتقی عبادی- ناصر صفایی

بهینه‌سازی محیط‌کشت و ترکیب ماده تنظیم‌کننده رشد در افزایش راندمان تولید گیاهچه در ریزازدیادی گردو ۵۶۵
مرضیه قربانی- خسرو پرویزی- محمد یزدان دوست همدانی- داراب حسنی

تمایز ارقام مقاوم ملون در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* بر اساس صفات ظاهری و الگوی حضور ژن‌های مقاومت ۵۷۹
فرهاد شکوهی فر- مجتبی ممرآبادی- صهبا طوسی

بررسی اثر پایه‌های مختلف بر شاخص‌های ریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' در زمان بلوغ تجاری. ۶۰۱
فاطمه احمدی- محمد مهدی شریفانی- امیر موسوی- نگین اخلاقی امیری- مصطفی خوشحال سرمست- خلیل زینلی‌نژاد

کاربرد پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر ماندگاری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی نگهداری در سردخانه ۶۱۳
کریم مندا حکی- حمید حسن‌پور

نشریه علوم باغبانی

(علوم و صنایع کشاورزی)

با شماره پروانه ۲۱/۲۰۱۵ ——— و درجه علمی – پژوهشی شماره ۲۶۵۲۴ ——— از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
۶۸/۴/۱۱ ۷۳/۱۰/۱۹

جلد ۳۸ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳

بر اساس مصوبه وزارت عتف از سال ۱۳۹۸، کلیه نشریات دارای درجه "علمی-پژوهشی" به نشریه "علمی" تغییر نام یافتند.

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: رضا ولی زاده — استاد – تغذیه نشخوارکنندگان (دانشگاه فردوسی مشهد)

سردبیر: علی تهرانی فر — استاد- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)

اعضای هیئت تحریریه:

آرویی، حسین — دانشیار- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
عابدی، بهرام — دانشیار- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
تهرانی فر، علی — استاد- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
شور، محمود — دانشیار- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
حقیقی، مریم — دانشیار- علوم باغبانی (دانشگاه صنعتی اصفهان)
حسن زاده مبینی، سعید — استاد- بخش بیولوژی (دانشگاه کویین کانادا)
خانی زاده، شاهرخ — پژوهشگر – موسسه کشاورزی و غذا اوتاوا کانادا
خزاعی، حمید — پژوهشگر مرکز جهانی اصلاح و تولید بذر سبزی تایوان
داوری نژاد، غلامحسین — استاد- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
راحمی، مجید — استاد – علوم باغبانی (دانشگاه شیراز)
زمانی، ذبیح اله — استاد – علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
شریفانی، محمد مهدی — دانشیار- علوم باغبانی (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)
عزیزی، مجید — استاد- گیاهان دارویی (دانشگاه فردوسی مشهد)
عبادی، علی — استاد- علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
فلاحی، اسماعیل — استاد- گروه علوم باغبانی دانشگاه آیداهوی آمریکا
فارسی، محمد — استاد- ژنتیک واصلاح نباتات (دانشگاه فردوسی مشهد)
کافی، محسن — استاد- گلکاری ومهندسی فضای سبز (دانشگاه تهران)
لاهوتی، مهرداد — استاد- فیزیولوژی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)
فوجی، یوشی هارو — استاد- دانشگاه کشاورزی و فناوری توکیو ژاپن

ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

این نشریه درپایگاه‌های زیر نمایه شده است:

AGRIS، CABI، DOAJ، EBSCO، Google scholar، Internet Archive، پایگاه استنادی جهان اسلام (ISC)، سامانه نشریات علمی ایران، پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID)، بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)، مرجع دانش CIVILICA

پست الکترونیکی: Jhorts4@um.ac.ir

مقالات این شماره در سایت https://jhs.um.ac.ir به صورت مقاله کامل نمایه شده است .

این نشریه به صورت فصلنامه (۴ شماره در سال) چاپ و منتشر می شود.

مندرجات

مقالات پژوهشی

اثر تراکم گیاه و الگوی کاشت بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیک گل لاله رقم 'Spryng' ۴۸۱

داود هاشم‌آبادی- بهزاد کاویانی- کبری شاکری کیاسرائی- رسول انسی‌نژاد- محمد رضا صفری مطلق

اثر همزیستی اندوفیت‌های *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 با دانهال‌های مکزیکن لایم تحت شرایط تنش شوری ۴۹۵

لیلا بقازاده دریایی- داود صمصام‌پور- عبدالنبی باقری- جلوه سهرابی‌پور

اثر باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر غلظت آهن، عملکرد و ترکیبات فنولیک کاهو ۵۱۱

پرستو مولائی- فاطمه نکونام- محمد بابااکبری ساری

ارزیابی اثر پایه بر میزان مقاومت برخی ارقام گلابی پیوندی به بیماری آتشک ۵۲۵

جواد صمیمی رباط- یحیی سلاح ورزی- علی تهرانی فر- ناصر بیک زاده

مطالعه مقاومت به خشکی در اکوتیپ‌های مختلف سیر بر اساس شاخص‌های تحمل در شرایط آب‌وهوایی همدان ۵۳۹

مهدی کاکایی

بررسی کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر عملکرد ریزوم و مواد مؤثره گیاه زنجبیل ۵۵۳

فائزه رضوانی نیا- محمّدتقی عبادی- ناصر صفایی

بهینه‌سازی محیط کشت و ترکیب ماده تنظیم‌کننده رشد در افزایش راندمان تولید گیاهچه در ریزازدیادی گردو ۵۶۵

مرضیه قربانی- خسرو پرویزی- محمد یزدان دوست همدانی- داراب حسنی

تمایز ارقام مقاوم ملون در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* بر اساس صفات ظاهری و الگوی حضور ژن‌های مقاومت ۵۷۹

فرهاد شکوهی فر- مجتبی ممرآبادی- صهبا طوسی

بررسی اثر پایه‌های مختلف بر شاخص‌های ریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی میوه پرتقال 'نامسون‌ناول' در زمان بلوغ تجاری ۶۰۱

فاطمه احمدی- محمد مهدی شریفانی- امیر موسوی- نگین اخلاقی امیری- مصطفی خوشحال سرمست- خلیل زینلی‌نژاد

کاربرد پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر ماندگاری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی نگهداری در سردخانه ۶۱۳

کریم مندا حکی- حمید حسن‌پور

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 479-492

Effect of Plant Density and Planting Pattern on Growth and Physiological Characteristics of Tulip cv. 'Spryng'

D. Hashemabadi[1*], B. Kaviani[2], K. Shakeri Kiasaraei[3], R. Onsinejad[4], M.R. Safari Motlagh[5]

1, 2, 3 and 4- Associate Professor, Professor, M.Sc. and Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: davoodhashemabadi@yahoo.com)
5- Professor, Department of Plant Protection, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 02-10-2021
Revised: 28-10-2021
Accepted: 31-10-2021
Available Online: 02-11-2021

How to cite this article:
Hashemabadi, D., Kaviani, B., Shakeri Kiasaraei, K., Onsinejad, R., & Safari Motlagh, M.R. (2024). Effect of plant density and planting pattern on growth and physiological characteristics of Tulip cv. 'Spryng'. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 479-492. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72661.1092

Introduction

Tulip flower (*Tulipa* L.) from the family Liliaceae is a bulbous and monocotyledon plant that has the highest level under cultivation among this family group. Tulips can be propagated by seeds and bulbs. Its seeds produce bulbs up to two years after planting and it takes six years for the bulbs to reach the flowering stage. In fields, the quality characteristics of flowers can be changed to some extent by changing some planting characteristics such as planting pattern and plant density. Some researchers have reported changes in the quantitative and qualitative characteristics of various crops and orchards, including ornamental plants, with changes in planting pattern and plant density. One effect of changes in planting patterns and plant density is alterations in photosynthesis and plant growth regulators. The purpose of this study was to identify the best planting pattern and determine the optimal planting density, as well as to examine the impact of these factors on the quantitative and qualitative characteristics of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'.

Materials and Methods

To evaluate the effect of planting pattern and density on growth and flower characteristics of tulip cv. 'Sprying', present study study was conducted as a factorial experiment based on completely randomized block design (RCBD) with 3 replications in 27 plots. The first factor was three planting patterns (square, triangle and rectangle) and three planting densities (25, 45 and 65 plant/m^2) as the second factor. Morphological and physiological traits such as height, length and diameter of stem, leaf and flower, flowering time, cut flower number, flower longevity, number, diameter and weight of bulb and bulblet, and the content of chlorophyll and carotenoid were measured. Statistical analysis of data was performed with SAS 9 software and mean comparison of the data with LSD test at 5% probability level. Graphs were drawn in Excel.

Results and Discussion

Results showed that the maximum number of cut flowers (59.90) was counted in plants cultivated in triangle cultivation design with planting density of 65 plants/m^2. The lowest time to start of flowering (69.30 days) and the highest content of leaf chlorophyll (13.57 µg/ml) was obtained in plants cultivated in trianle cultivation design with planting density of 45 plants/m^2. The most flower longevity (12.73 day) and the highest content of carotenoid (1.68 µg/ml) was obtained in plants cultivated in square cultivation design with planting density of 45 plants/m^2. The height of the flowering stem is one of the important traits for the marketing of cut flowers. The results of the present study showed that the height of the tulip plant was affected by plant density and planting pattern. This result was consistent with the results reported by some researchers. At low plant densities, long plant spacing reduces plant

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72661.1092

competition for water and nutrient uptake, resulting in larger plant growth and leaf size. Also, long plant distances cause the roots to develop and grow, and the leaves to grow and thicken. Increasing the vegetative competition of adjacent plants at high densities causes photosynthetic organs to be placed in the shade (change in the quantity and composition of the received radiation spectrum in the shade leaves), which has a great effect on the balance of plant growth regulators, resulted in longitudinal and superficial growth of plant organs. It intensifies the longitudinal growth of the petiole and accelerates all the developmental processes of the plant. Plant morphology and angle of leaf deviation can also be effective in increasing leaf size. Uniform distribution of plants and greater absorption of light and nutrients increased leaf length and width. The results revealed that plants compete for light and nutrients, and in these competitive conditions, roots and stems are taller than optimal, and the distance between nodes increases. The effect of planting pattern on flowering process can be related to changes in plant photosynthesis and the availability of photosynthetic materials for the developing reproductive parts. Changes in planting distance or pattern can alter inflorescence characteristics by affecting root growth and modifying the production of plant growth regulators in the roots. These regulators are then transferred to the aerial parts, influencing inflorescence characteristics. Adjusting the planting distance or pattern can also impact various traits of bulbs and bulblets in bulbous plants. Competition for receiving maximum light and photosynthesis is a key factor in changing bulb and bulblet traits. This competition is influenced by planting arrangement and plant density. Some studies have shown that planting pattern and plant density affect the amount of plant pigments such as chlorophyll and carotenoids, the main reason being the difference in light intake.

Keywords: Family Liliaceae, Flower quality, Planting pattern and density, Tulip flower

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۴۷۹-۴۹۲

اثر تراکم گیاه و الگوی کاشت بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیک گل لاله رقم 'Spryng'

داود هاشم‌آبادی[۱*] - بهزاد کاویانی[۲] - کبری شاکری کیاسرائی[۳] - رسول انسی‌نژاد[۴] - محمد رضا صفری مطلق[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۹

چکیده

گل لاله (*Tulipa* L.) از خانواده سوسن، از گل‌های پیازی و تک‌لپه می‌باشد که با بذر و سوخ قابل تکثیر است. مدت زمان از کاشت بذر تا تولید گل در این گیاه طولانی است. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی اثر تراکم و الگوی کاشت بر ویژگی‌های رشد رویشی و گلدهی در گل لاله رقم 'Spryng' بود. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در ۲۷ پلات انجام گردید. سه الگوی کاشت (مربع، مثلث و مستطیل) به‌عنوان فاکتور اول و سه تراکم کاشت (۲۵، ۴۵ و ۶۵ پیاز در هر متر مربع) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک در مرحله رشد رویشی و زایشی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد شاخه گل بریده (۵۹/۹۰) در گیاهان کاشته‌شده در الگوی کاشت مثلثی با تراکم کاشت ۶۵ گیاه در هر متر مربع شمارش شد. کمترین زمان تا آغاز گلدهی (۶۹/۳۰ روز) و بالاترین میزان کلروفیل برگ (۱۳/۵۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) در گیاهان کاشته‌شده در الگوی کاشت مثلثی با تراکم کاشت ۴۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. بیشترین ماندگاری گل (۱۲/۷۳ روز) و بالاترین میزان کاروتنوئید (۱/۶۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) در گیاهان کاشته‌شده در الگوی کاشت مربعی با تراکم کاشت ۴۵ بوته در هر متر مربع حاصل شد. در مجموع، نتایج کلی این پژوهش نشان داد که تراکم ۴۵ بوته در متر مربع و الگوی کاشت مثلث یا مربع، برای بهبود خصوصیات کمی و کیفی گل لاله در شرایط آب و هوایی گیلان مناسب است.

واژه‌های کلیدی: الگو و تراکم کاشت، کیفیت گل، گل لاله، گیاهان پیازی

مقدمه

جنس لاله (*Tulipa* spp.) متعلق به خانواده سوسنیان (Liliaceae) است که گونه‌های آن بیشتر در مناطق معتدله و نیمه‌گرمسیری نیمکره شمالی پراکنش دارند. این جنس حدود ۱۰۰-۸۰ گونه دارد. لاله دارای سوخ (پداژه) پوشش‌دار است. سوخ بالغ لاله دارای ۶ برگ فلسی اندوخته‌ای است که به صفحه پایگاهی چسبیده اند. در محور هر فلس یک جوانه روی صفحه پایگاهی قرار دارد که این جوانه‌ها می‌توانند به سوخ گل‌دهنده تبدیل شوند. بالاترین جوانه محوری، چهار برگ و یک گل انتهایی تولید می‌کند. از هر سوخ لاله، به‌مدت سه سال می‌توان گل مرغوب به دست آورد (Ghasemi Ghehsareh & Kafi, 2009). لاله از جمله گیاهان پیازی است که بالاترین سطح زیرکشت را در میان این گروه از گیاهان به خود اختصاص داده است. لاله با بذر و سوخ قابل تکثیر است. بذر آن تا دو سال پس از کاشت تولید سوخ می‌کند و شش سال طول می‌کشد تا سوخ به مرحله گلدهی برسد. در لاله از رشد رویشی جوانه‌های محوری، سوخک‌هایی در اطراف سوخ اصلی تشکیل می‌شوند که می‌توان از آنها در تکثیر تجاری لاله استفاده کرد (Ghannadi, 1992). گیاه لاله با توجه به ارزش اقتصادی بالا، تنوع بی‌نظیر در ارقام مختلف و رنگ گلبرگ، از بازارپسندی بالایی برخوردار می‌باشد. با توجه به اینکه یکی از معیارهایی که به گل ارزش می‌دهد، خصوصیات کمی و کیفی عالی گل در زمان باز شدن می‌باشد؛ این موضوع مورد توجه اکثر شرکت‌های خصوصی است. این شرکت‌ها برای افزایش کیفیت معمولاً از هورمون‌های گیاهی یا مواد شیمیایی که هزینه زیادی دارند بهره می‌برند. در مزارع می‌توان با تغییر برخی از خصوصیات کاشت مانند الگو و تراکم کاشت تا حدودی به این صفات دست یافت که موجب کاهش هزینه‌های ناشی از استفاده از مواد شیمیایی می‌شود (Singh, 2006).

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشیار، استاد، کارشناسی ارشد و استادیار، گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

(*- نویسندهٔ مسئول: Email: davoodhashemabadi@yahoo.com)

۵- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72661.1092

تراکم کاشت گیاه در مزرعه یکی از عوامل مهم در تعیین عملکرد و کیفیت محصولات زراعی-باغی محسوب می‌شود که روی خصوصیات مورفولوژیکی برخی گیاهان اثرگذار است (Ibrahim, Baghdadi *et al*., 2014; Mladenović *et al*., 20202012 ;). تراکم کاشت بیشتر از نظر هزینه کار و زمین مورد توجه می‌باشد و مناسب‌ترین تراکم کاشت بایستی بیشترین سود اقتصادی را داشته باشد تا عملکرد بیشتر در واحد سطح را توجیه نماید. در تراکم کمتر از حد بهینه، استفاده از عوامل محیطی مانند نور، رطوبت و مواد غذایی حداکثر نیست و در تراکم بیشتر از حد بهینه نیز وجود رقابت شدید از عملکرد نهایی محصول می‌کاهد (Sher *et al*., 2018; Mladenović *et al*., 2020). مطالعه روی ژنوتیپ‌های مختلف آفتاب‌گردان زینتی نشان داد که اگرچه تراکم کاشت اثر معنی‌داری روی محیط ساقه، قطر گل و طول ساقه داشت، اما اثر آن روی زمان گلدهی کم بود (Mladenović *et al*., 2020). این محققان بیان کردند که کیفیت گل و بازدهی مطلوب می‌تواند با مدیریت صحیح تراکم کاشت به‌دست آید.

در ارتباط با سوخ‌ها، تراکم کاشت می‌تواند از نظر مدیریت مبارزه با آفات و بیماری‌ها، بیرون آوردن سوخ‌ها از خاک و تعیین بهترین روش آبیاری و کوددهی نیز مهم باشد. اولین تأثیر افزایش تراکم جمعیت گیاهی، افزایش رقابت بین بوته‌های مجاور و قرار گرفتن اندام‌های فتوسنتز کننده در سایه (تغییر در کمیت و ترکیب طیف تابشی دریافتی در برگ‌های تحت سایه) است که تأثیر زیادی بر تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد دارد و در بررسی‌های متعددی به‌صورت افزایش سطح جیبرلین‌ها مشخص شده است و اثرات کلی آن تشدید رشد طولی پهنک و تسریع تمام فرآیندهای نموی گیاه است (Niknejad & Yahya, 1994). مطالعات زیادی اثر تراکم کاشت روی تغییر کمیت و کیفیت گیاهان زینتی سوخ‌دار از جمله نرگس (Daneshvar & Heidari, 7Moraes-Cerdeira *et al*., 199 ; 2011)، لاله (Jhon *et al*., 2008) و گلایول (Klasmand *et al*., 1995 ; Bahar & Korkut, 1998; Bijimol & Singh, 2001; Singh *et al*., 2001) را نشان داده‌اند. جان و همکاران (Jhon *et al*., 2008) گزارش کردند که تعداد و وزن پیاز و پیازچه‌های لاله در تراکم کاشت ۶۰ پیاز در هر متر مربع به‌طور قابل توجهی بیشتر از تراکم‌های پایین‌تر (۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیاز در هر متر مربع) بوده است. ساین (Singh, 2006) نشان داد که فاصله کاشت کمتر (۱۰ × ۲۰ سانتی‌متر) موجب تأخیر در گلدهی نسبت به فاصله کاشت بیشتر (۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر) در گل مریم شد. پرکاش و همکاران (Parkash *et al*., 2006) طی آزمایشی، بهترین عملکرد گل و تعداد پیاز را در فاصله کاشت ۱۵ × ۲۰ سانتی‌متر در گل مریم به دست آوردند. و همکاران (Mane *et al*., 2007) مشاهده کردند که فاصله کاشت بیشتر (۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر) موجب افزایش تعداد روزهای لازم برای جوانه‌زدن (۱۱/۳۹ روز) در مقایسه با فاصله کاشت کمتر (۲۰ × ۱۵ سانتی‌متر) (۹/۵ روز) در گل مریم شد. در آفتاب‌گردان، فاصله ۷۰ سانتی‌متر بین ردیف‌ها و ۳۰-۲۰ سانتی‌متر درون ردیف‌ها، در آفتاب‌گردان زینتی، ۵۰ سانتی‌متر بین ردیف‌ها و ۱۵ سانتی‌متر درون ردیف‌ها و برای ژربرا، ۳۰ × ۳۰ سانتی‌متر فضای بهینه کشت بود (Bhosale *et al*., 2012; Kaya *et al*., Balalić *et al*., 2012 ; 2012).

تغییر الگوی کاشت نیز یکی از رویکردهایی است که می‌تواند تراکم، مدیریت زراعی و فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاهان مانند فتوسنتز را تحت تأثیر قرار دهد (San-oh *et al*., 2006). رعایت الگوی کاشت مناسب باعث افزایش جذب نور به‌وسیله برگ‌ها، افزایش رشد و افزایش عملکرد می‌شود (Ehsanzadeh & Zarean Baghdadabadi, 2003). تراکم کشت بالا باعث طویل و نازک شدن ساقه می‌شود که خود نوعی سازگاری برای دریافت نور بیشتر است (Süzer, 2011Rajcan & Swanton, 2001 ;). مراحل نموی و تمایزی گیاهان در مواجهه با تغییرات محیطی، تغییر می‌یابد که اغلب این تغییرات برای سازگاری بهتر است (Sher *et al*., 2018).

تعیین تراکم بهینه و الگوی کاشت مناسب برای استفاده مطلوب از نهاده‌ها (زمین، آب، نور و مواد غذایی) نقش مفید و مؤثری دارد و موجب افزایش کمی و کیفی محصول می‌شود. دانشور و حیدری (Daneshvar & Heidari, 2009) نشان دادند که با کاشت پداژه گلایول در طرح مربع و فاصله ۲۰ سانتی‌متر، ارتفاع ساقه گل‌دهنده به طور معنی‌داری بیشتر از کاشت پداژه در فاصله ۱۵ و ۲۵ سانتی‌متر در هر دو طرح مثلث و مربع بود. در هر دوی این طرح‌ها، افزایش فاصله کاشت موجب کاهش تعداد پداژه‌های جدید گردید. و همکاران (Gomes *et al*., 2007) با بررسی اثر تراکم و الگوی کاشت روی گیاه همیشه‌بهار اعلام کردند، حداکثر بیوماس در تراکم ۹۱۰۳۷ بوته در هکتار به‌دست آمد و نتیجه گرفتند هر قدر فاصله ردیف‌ها کاهش و تراکم بوته‌ها افزایش یابد تعداد گلبرگ و قطر آن کاهش می‌یابد.

در ایران و جهان در ارتباط با تأثیر متقابل تراکم و الگوی کاشت پیاز بر کیفیت گل لاله مطالعه زیادی انجام نشده است. این مطالعه به منظور تعیین بهترین تراکم و الگوی کاشت پیاز بر کیفیت گل لاله انجام شد. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، معرفی بهترین الگوی کاشت، تعیین بهترین تراکم کاشت و بررسی دقیق اثر الگو و تراکم کاشت بر خصوصیات کمی و کیفی گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng' بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پیازهای گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng' با میانگین قطر ۵/۴۸ سانتی‌متر که قبلاً در معرض پیش‌تیمار سرمادهی قرار گرفته بودند در اواخر دی ماه از یک مؤسسه خصوصی در شهرستان محلات تهیه شدند.

آماده‌سازی بسترهای کاشت

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در کرت‌هایی به مساحت ۰/۶ متر مربع (ابعاد ۱۲۰ × ۵۰ سانتی‌متر) در ۳ تکرار و ۹ تیمار و مجموعاً ۲۷ پلات (کرت) در روستای میرمحله از توابع ماسال و شاندرمن در شمال ایران اجرا شد. محل آزمایش در فاصله ۶۵ کیلومتری شهرستان رشت و بین عرض های جغرافیایی ´۱۸ و °۳۷ تا ´۲۹ و °۳۷ شمالی و طول‌های جغرافیایی´۴۳ و °۴۸ تا ´۱۱ و °۴۹ شرقی قرار گرفته است. محل کشت پیازها دارای متوسط سالانه درجه حرارت ۱۵/۱ درجه سانتی گراد است که این میزان بین ۶ درجه در ماه اسفند تا ۲۴/۷ درجه در ماه مرداد تغییر می‌یابد. میزان رطوبت نسبی نیز ۸۳ درصد می‌باشد. سه الگوی کاشت (مربع: P_1؛ مثلث: P_2؛ مستطیل: P_3) به‌عنوان فاکتور اول و سه تراکم کاشت (۶۵: D_1؛ ۴۵: D_2؛ ۲۵: D_3 بوته در متر مربع) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. برای آماده‌کردن زمین و تهیه کرت‌ها، قطعه زمین مورد نظر تا عمق ۲۰ سانتی‌متر در دی ماه شخـم زده شد. سپس زمین محل آزمایش کرت‌بندی شد و ارتفاع کرت‌ها توسط مخلوط ماسه و خاک‌برگ ۲۰ سانتی‌متر از سطح زمین بالا آورده شد (شکل ۱A). پیازهای گل لاله رقم 'Spryng' با اندازه های یکسان (میانگین قطر پیاز ۵/۴۸ سانتی‌متر) انتخاب شدند و قبل از کاشت با قارچ‌کش بنومیل (غلظت ۵ در هزار) ضدعفونی سطحی گردیدند و کشت شدند. کلیه عملیات داشت مانند آبیاری، وجین علف هرز و مبارزه با آفات و بیماری‌ها در تمام کرت‌ها بطور یکنواخت انجام گردید. با توجه به بارندگی و رطوبت بالای هوا در استان گیلان به ویژه در بهار و زمستان، آبیاری در صورت نیاز انجام شد. کوددهی سه ماه پس از کشت پیازها به‌صورت؛ ۱۴۰ کیلوگرم در هکتار کود ازت، ۵۰ کیلوگرم در هکتار کود فسفر، ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار پتاسیم و ۱۱۰ کیلوگرم در هکتار کود کلسیم انجام شد. البته، در پاییز و قبل از کاشت نیز مقادیر مشابه از فسفر و پتاسیم به بستر افزوده شد. گلدهی بوته‌ها (شکل ۱– B, C) از هفته آخر اسفند ماه آغاز گردید و برداشت پیازها نیز در آخر خرداد بعد از خشک‌شدن برگ‌ها انجام گرفت.

شکل ۱– زمین کرت‌بندی‌شده محل آزمایش (A)، گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng' مورد استفاده در آزمایش حاضر (B)، ظاهرشدن گلبرگ‌ها به عنوان آغاز زمان گلدهی (C) و آغاز پژمرده‌شدن گل‌ها با مشاهده پلاسیدگی روی لبه‌های گلبرگ (D)

Figure 1- Plotted land of the experimental site (A), tulip flower (*Tulipa* L.) variety 'Spryng' used in the present experiment (B), the appearance of the petals as the beginning of the flowering time (C) and the beginning of the withering of the flowers by observing the fading on the edge of petals (D)

اندازه‌گیری صفات

رشد و نمو بخش رویشی و زایشی در لاله همزمان صورت می گیرد، بنابراین صفاتی همچون ارتفاع و قطر ساقه، طول و عرض برگ در مرحله باز شدن گل (۷۰ روز پس از کاشت پیاز) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری صفات رویشی و زایشی و صفات مربوط به پیاز، از هر کرت (پلات) ۵ بوته به‌صورت تصادفی گزینش شد و صفات مورد نظر اندازه‌گیری و سپس میانگین آنها ثبت گردید. ارتفاع از سطح خاک تا بالاترین نقطه گل با خط‌کش و با مقیاس سانتی‌متر اندازه گیری شد. قطر ساقه در محل ۲۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح خاک با کولیس و با مقیاس میلی‌متر اندازه‌گیری شد. دومین برگ گیاه از انتهای ساقه با خط‌کش و با مقیاس سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. قطر گل در مرحله باز شدن کامل گل با کولیس و با مقیاس میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تعداد روزهای طی‌شده پس از کاشت پیاز تا ظاهر شدن گلبرگ‌ها به‌عنوان مدت زمان گلدهی تعیین گردید. تفاضل بین گلدهی و زمان آغاز پژمرده‌شدن گل (شکل ۱ –D) در هر تیمار به عنوان مدت زمان ماندگاری گل اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید گلبرگ و کلروفیل برگ، از تیمارهای مختلف (در مرحله باز شدن کامل گل) به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شد. مقدار ۰/۵ گرم از گلبرگ و برگ هر بوته وزن شد و در هاون چینی با محلول ۸۰ سی‌سی استون همراه با ۲۰ سی‌سی آب مقطر کاملاً له گردید. سپس عصاره حاصل از صافی رد شد و در ظروف کوچک (کوت) ریخته شد و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در سه طول موج ($A_{(۴۴۰)}$، $A_{(۶۴۵)}$، $A_{(۶۶۳)}$) برای کاروتنوئید و دو طول موج ($A_{(۶۴۳)}$، $A_{(۶۶۰)}$) برای کلروفیل قرائت گردید.

$$= ۴/۶۹ \times A_{(۴۴۰)} - ۰/۲۶۸ \times ۲۰/۲ \times A_{(۶۴۵)} + ۸/۰۲ \times A_{(۶۶۳)}$$

کاروتنوئید ($\mu g.ml^{-1}$)

$$\text{کلروفیل a } (\mu g/ml) = ۹/۹۳ \times A_{(۶۶۰)} - ۰/۷۷۷ \times A_{(۶۴۳)}$$

$$\text{کلروفیل b } (\mu g/ml) = ۱۷/۶ \times A_{(۶۴۳)} - ۲/۸۱ \times A_{(۶۶۰)}$$

$$\text{کلروفیل کل } (\mu g/ml) = ۷/۱۲ \times A_{(۶۶۰)} + ۱۶/۸ \times A_{(۶۴۳)}$$

در خرداد ماه، قطر پیاز (پیازچه) به‌وسیله کولیس و با مقیاس میلی‌متر و تعداد پیاز (پیازچه) حاصل با شمارش مشخص گردید. وزن تر پیازها، پیازچه‌ها و اندام هوایی پس از پایان دوره گلدهی و برداشت، با ترازوی دیجیتالی حساس توزین گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک، پیازها، پیازچه‌ها و اندام هوایی به‌صورت جداگانه به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و مجدداً توزین گردیدند. وزن تر و خشک با مقیاس گرم توزین و بیان گردیدند. سپس از تقسیم وزن خشک به وزن تر ضربدر صد، درصد ماده خشک پیاز، پیازچه و اندام هوایی به‌دست آمد. در مرحله باز شدن کامل گل، گلبرگ‌ها برداشت شدند و وزن تر، وزن خشک و درصد ماده خشک گلبرگ‌ها به‌روش فوق اندازه‌گیری شدند.

تجزیه آماری

تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودار با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

اثر تراکم گیاه و الگوی کاشت بر صفات رویشی و زایشی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل تراکم گیاه و الگوی کاشت روی صفات ارتفاع ساقه، قطر ساقه، طول برگ، زمان گلدهی و ماندگاری گل در سطح احتمال ۵ درصد و روی تعداد شاخه گل بریده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بررسی برهم‌کنش تیمارهای تراکم گیاه و الگوی کاشت نشان داد که بیشترین ارتفاع ساقه (۴۱/۰۸ سانتی‌متر) و تعداد گل شاخه‌بریده (۵۹/۹۰) در تیمار الگوی مثلث و ۶۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. کمترین ارتفاع ساقه (۳۵/۲۸ سانتی‌متر) و تعداد گل شاخه‌بریده (۱۷/۲۸) در تیمار مستطیل و ۲۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد (جدول ۴). این جدول نشان می‌دهد که الگوهای کاشت مربع و مثلث در تراکم ۲۵ بوته در هر متر مربع، به‌ترتیب با تولید ۱۸/۸۸ و ۱۹/۴۴ گل شاخه‌بریده، الگوها و تراکم مناسبی برای تولید گل با تعداد بالا نبودند. مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که بالاترین قطر ساقه گل‌دهنده (۴/۵۸ میلی‌متر) و بیشترین ماندگاری گل (۱۲/۷۳) در الگوی مربع و تراکم ۴۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. در هر دوی این صفات، کمترین ارزش در الگوی کاشت مستطیلی و تراکم ۶۵ بوته در هر متر مربع محاسبه شد. بالاترین طول برگ (۱۴/۴۶ سانتی‌متر) در الگوی کاشت مربع و تراکم ۶۵ بوته در هر متر مربع و سریع‌ترین زمان گلدهی (۶۹/۳۰ روز) در الگوی مثلث و تراکم ۴۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. الگوی مثلثی و تراکم ۲۵ و ۴۵ بوته در هر متر مربع، به‌ترتیب کمترین ارزش طول برگ و کندترین زمان تا گلدهی را تحریک کردند (جدول ۴).

ارتفاع ساقه گل‌دهنده یکی از صفات مهم برای بازارپسندی گل های شاخه بریده می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ارتفاع گیاه لاله تحت تأثیر تراکم گیاه و الگوی کاشت قرار گرفته است. این نتیجه با یافته‌های دانشور و حیدری (Daneshvar & Heidari, 2011) روی گل سوسن منطبق است. شارما و گوپتا (Sharma & Gupta, 2003) نشان دادند که افزایش فاصله کاشت منجر به افزایش ارتفاع در گلایول گردید. در تراکم‌های پائین گیاه، فواصل زیاد بوته‌ها از یکدیگر باعث کاهش رقابت ریشه‌های گیاهان در جذب آب

و مواد غذایی می‌شود در نتیجه رشد بوته‌ها افزایش می‌یابد و ابعاد برگ بزرگ‌تر خواهد شد. همچنین فواصل زیاد بوته باعث توسعه و رشد ریشه‌ها، افزایش فعالیت فیزیولوژیک ریشه‌ها مانند تولید تنظیم‌کننده‌های رشد و بزرگ‌شدن و ضخیم‌شدن برگ‌ها می‌گردد (Vaziri *et al*., 2010). افزایش رقابت رویشی بوته‌های مجاور در تراکم‌های بالا، موجب قرار گرفتن اندام‌های فتوسنتزکننده در سایه (تغییر در کمیت و ترکیب طیف تابشی دریافتی در برگ‌های تحت سایه) می‌شود که این امر تأثیر زیادی بر تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از جمله سطح جیبرلین دارد و اثرات کلی آن تشدید رشد طولی پهنک و تسریع تمام فرآیندهای نموی گیاه است (Niknejad & Yahya, 1994). مورفولوژی گیاه و زاویه انحراف برگ نیز می‌تواند در افزایش ابعاد برگ مؤثر باشد. پراکنش یکنواخت بوته‌ها و جذب بیشتر نور و مواد غذایی باعث افزایش طول و عرض برگ می‌شود (Mladenović *et al*., 2020; Niknejad & Yahya, 1994).

ارتفاع گیاه خرزهره در تراکم ۲۵ گیاه در هر متر مربع زیاد بود در حالی‌که بالاترین تعداد شاخه در تراکم ۱۰ گیاه در هر متر مربع به دست آمد (Kumar *et al*., 2007). نتایج مشابه در ارتباط با بازدهی گل، بازدهی روغن و بازدهی کل گیاه در خرزهره (Ghobadi & Ghobadi, 2010; Moosavi *et al*., 2012)، سوسن (Amjad & Ahmad, 2012) و گلرنگ (Roghayeh *et al*., 2012) گزارش شد. در آفتاب‌گردان زینتی تراکم‌های مختلف کاشت روی قطر گل، محیط ساقه و طول ساقه اثر داشت. کمترین قطر گل، نازک‌ترین محیط ساقه و طویل‌ترین ارتفاع ساقه در متراکم‌ترین فضای کاشت (۲۵ × ۲۵ سانتی‌متر) حاصل شد، اگرچه تراکم کاشت اثری روی زمان گلدهی نداشت (Mladenović *et al*., 2020). این نتایج نشان داد که گلدهی یک صفت نسبتاً پایدار است و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار دارد. در حالی‌که قطر ساقه تحت تأثیر تراکم کاشت قرار داشت. پژوهش حاضر این نتیجه را تأیید کرد زیرا تراکم کاشت اثر معنی‌داری روی زمان گلدهی نداشت. قطر گل باید جذابیت، ثبات و حمل و نقل آنرا توجیه کند. مجیری و ارزانی (Mojiri & Arzani, 2003) نشان دادند که در آفتاب‌گردان، تراکم کاشت بیشتر باعث تولید گل‌هایی با قطر کمتر و طول ساقه و طول گیاه بیشتر شد. و همکاران (Beg *et al*., 2001) نشان دادند که در شرایط تراکم کاشت بالا، ساقه‌های نازک‌تری تولید می‌شود. این نتایج آشکار کرد که گیاهان برای نور و مواد مغذی با یکدیگر رقابت می‌کنند و در این شرایط رقابتی، ریشه و ساقه بلندتری نسبت به حد بهینه دارند و فواصل بین میانگره‌ها افزایش می‌یابد (Craine &Ali *et al*., 2011; Dybzinski, 2013; Ford, 2014).

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر الگوی کاشت و تراکم گیاه روی صفات رویشی و زایشی گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng'

Table 1- ANOVA (mean squares) for the effect of planting pattern and plant density on the vegetative and reproductive traits of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	ماندگاری گل Flower longevity	قطر گل Flower diameter	تعداد شاخه گل بریده Number of cut flower	زمان گلدهی Flowering time	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	قطر ساقه Stem diameter	ارتفاع ساقه Stem height
تکرار Replicate	2	0.0134^{ns}	0.8326^{ns}	3.32^{ns}	0.0047^{ns}	0.0572^{ns}	0.1140^{ns}	0.00173^{ns}	25.57**
الگوی کاشت Planting pattern (A)	2	0.2158**	2.403*	81.48**	1.5788**	0.1584*	0.3422*	0.0716**	5.124*
تراکم گیاه Plant density (B)	2	0.555**	26.12**	74.57**	0.191^{ns}	0.4624**	1.548**	0.0225*	26.31**
الگو × تراکم A × B	4	0.0636*	1.024^{ns}	40.60**	0.323*	0.0505^{ns}	0.3507*	0.0174*	4.63*
خطا Error	16	0.0171	0.494	2.01	0.075	0.038	0.089	0.0062	1.357
کل Total	26	–	–	–	–	–	–	–	–
ضریب تغییرات C.V (%)	–	1.07	1.93	3.38	1.39	1.93	2.2	1.77	3.058

*، **، ns به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

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

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر الگوی کاشت و تراکم گیاه روی صفات پیاز و پیازچه گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng'

Table 2- ANOVA (mean squares) for the effect of planting pattern and plant density on the bulb and bulblet traits of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	درصد ماده خشک پیازچه Bulblet dry matter percentage	وزن تر پیازچه Bulblet fresh weight	قطر پیازچه Bulblet diameter	تعداد پیازچه Bulblet number	درصد ماده خشک پیاز Bulb dry matter percentage	وزن تر پیاز Bulb fresh weight	قطر پیاز Bulb diameter	تعداد پیاز Bulb number
تکرار Replicate	2	0.949^{ns}	0.0049^{ns}	0.262^{ns}	0.020^{ns}	4.71^{ns}	0.7543*	0.2584^{ns}	0.0056^{ns}
الگوی کاشت Planting pattern (A)	2	18.69**	0.527**	10.28**	0.377**	19.58*	8.378**	1.518**	0.062**
تراکم گیاه Plant density (B)	2	0.729^{ns}	0.552**	2.918**	0.252**	29.17**	0.128^{ns}	0.284^{ns}	0.094**
الگو × تراکم A × B	4	22.80**	0.666**	2.97**	0.089**	9.34*	1.537**	0.616*	0.0195**
خطا Error	16	1.172	0.042	0.516	0.01	1.99	0.202	0.164	0.025
کل Total	26	–	–	–	–	–	–	–	–
ضریب تغییرات C.V (%)	–	3.36	4.73	3.39	4.67	6.47	1.99	1.1	3.16

*، **، ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

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

نتایج نشان داد که تغییر تراکم و الگوی کاشت می‌تواند روی زمان ظهور گل‌ها تا حدی مؤثر باشد. این نتایج با گزارش دانشور و حیدری (Daneshvar & Heidari, 2009) که عنوان داشتند روند ظهور ساقه‌های گل‌دهنده تحت تأثیر الگو و فاصله کاشت قرار دارد، مطابقت دارد. احتمالاً تأثیر الگوی کاشت بر روند گلدهی می‌تواند مربوط به تغییر در فتوسنتز گیاه و فراهم‌بودن مواد فتوسنتزی برای بخش‌های زایشی در حال نمو باشد. افزایش فاصله کاشت موجب کاهش قطر گل در گل بریده نرگس گردید (Daneshvar & Heidari, 2009). تغییر فاصله و یا الگوی کاشت از طریق تأثیر بر گسترش ریشه موجب تغییر در تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌شود که از ریشه به قسمت هوایی منتقل می‌گردند و خصوصیات گل‌آذین مانند گل‌انگیزی و رشد اندام‌های زایشی را تغییر می‌دهند (Corbesier *et al.*, 2003). بر خلاف یافته‌های پژوهش حاضر، گومز و همکاران (Gomes *et al.*, 2007) گزارش دادند که هر قدر فاصله ردیف‌ها کاهش و تراکم بوته‌ها افزایش یابد، تعداد گلبرگ و قطر آن کاهش می‌یابد. افزایش میزان ماندگاری گل یکی از موارد مهم برای تولیدکنندگان گیاهان زینتی می‌باشد.

اثر تراکم گیاه و الگوی کاشت بر صفات مربوط به پیاز و پیازچه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل تراکم گیاه و الگوی کاشت روی همه صفات مربوط به پیاز و پیازچه معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر تیمارهای تراکم گیاه و الگوی کاشت (جدول ۵) نشان داد که بیشترین تعداد پیاز (۱/۷۶) و بالاترین درصد ماده خشک پیازچه (۳۵/۲۶) در تیمار الگوی مثلث و تراکم ۶۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. کمترین تعداد پیاز (۱/۴۱) در الگوی کاشت مربع و مثلث در تراکم ۲۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد (جدول ۵). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه (۲/۵۸)، بالاترین قطر پیاز (۳۷/۵۷ میلی‌متر) و بالاترین وزن تر پیاز (۲۴/۶۶ گرم) در الگوی کاشت مربع و تراکم ۲۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. الگوی کاشت مستطیل و تراکم ۶۵ بوته در هر متر مربع با تحریک تولید ۲/۵۰ پیازچه، تیمار مناسبی بود. کمترین تعداد پیازچه (۱/۸۳) در الگوی کاشت مثلث در تراکم ۴۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد (جدول ۵). در هر سه صفت؛ وزن خشک پیاز، قطر پیازچه و وزن تر پیازچه، بالاترین ارزش (به‌ترتیب با ۳۰/۵۸ گرم، ۲۲/۹۷ میلی‌متر و ۵/۰۲ گرم) در الگوی کاشت مثلثی و تراکم ۲۵ بوته در هر متر مربع محاسبه شد.

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر الگوی کاشت و تراکم گیاه روی صفات فیزیولوژیک گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng'

Table 3- ANOVA (mean squares) for the effect of planting pattern and plant density the on physiologic traits of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	کاروتنوئید گلبرگ Petal carotenoid	درصد ماده خشک گلبرگ Dry matter percentage of petal	وزن تر گلبرگ Petal fresh weight	درصد ماده خشک اندام هوایی Dry matter percentage of aerial organ	وزن تر اندام هوایی Fresh weigh of aerial organ
تکرار Replicate	2	0.063^{ns}	0.065^{ns}	0.071^{ns}	0.047^{ns}	0.0413^{ns}	0.032^{ns}	0.0127^{ns}	2.306**
الگوی کاشت Planting pattern (A)	2	5.827**	40.401**	3.818**	0.167**	0.1867*	0.036^{ns}	0.2855**	1.069^{ns}
تراکم گیاه Plant density (B)	2	2.79**	0.352**	1.058**	0.025*	0.4019**	0.305**	2.052**	31.99**
الگو × تراکم A × B	4	0.117**	0.021^{ns}	0.278**	0.032*	0.8301**	0.378**	0.1069**	3.074**
خطا Error	16	0.022	0.021	0.055	0.007	0.4	0.045	0.014	0.327
کل Total	26	–	–	–	–	–	–	–	–
ضریب تغییرات C.V (%)	–	1.24	2.87	3.3	5.91	2.14	2.3	1.13	1.57

*، **، ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

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

جدول ٤- اثر متقابل الگوی کاشت × تراکم گیاه روی صفات رویشی و زایشی گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng'

Table 4- The interaction effect of planting pattern × plant density on the vegetative and reproductive traits of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'

تیمارها (الگوی کاشت × تراکم گیاه) Treatments (planting design × plant density)	ماندگاری گل Flower longevity (day)	تعداد شاخه گل بریده Number of cut flower	زمان گلدهی Flowering time (day)	طول برگ Leaf length (cm)	قطر ساقه Stem diameter (mm)	ارتفاع ساقه Stem height (cm)
مربع × ۶۵ بوته در هر متر مربع Square × 65 plantlet/m^2	12.03c	56.60c	70.43ab	14.46a	4.48ab	39.85ab
مربع × ۴۵ بوته در هر متر مربع Square × 45 plantlet/m^2	12.73a	32.20e	7026ab	13.53bc	4.58a	37.85bc
مربع × ۲۵ بوته در هر متر مربع Square × 25 plantlet/m^2	12.33b	18.88f	70.56a	13.38bc	4.51ab	37.41cd
مثلث × ۶۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 65 plantlet/m^2	11.96c	59.90a	70.07ab	13.89b	4.49ab	41.08a
مثلث × ۴۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 45 plantlet/m^2	12.30b	36.10d	69.30d	13.91b	4.49ab	39.68ab
مثلث × ۲۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 25 plantlet/m^2	11.96c	19.44f	69.53cd	12.98c	4.54ab	36.30cd
مستطیل × ۶۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 65 plantlet/m^2	11.82c	55.50b	70.43ab	13.43bc	4.26c	38.31bc
مستطیل × ۴۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 45 plantlet/m^2	12.28b	31.10e	70.56a	13.74b	4.43ab	37.13cd
مستطیل × ۲۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 25 plantlet/m^2	12.26b	17.28f	69.93bc	13.03c	4.40b	35.28d

در هر ستون حروف مشترک عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

جدول ۵- اثر متقابل الگوی کاشت و تراکم گیاه روی صفات پیاز و پیازچه گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng'

Table 5- The interaction effect of planting pattern ×plant density on the bulb and bulblet traits of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'

تیمارها (الگوی کاشت × تراکم گیاه) Treatments (planting design × plant density)	ماده خشک پیاز Bulblet dry matter (%)	وزن تر پیاز Bulblet fresh weight (g)	قطر پیاز Bulblet diameter (mm)	تعداد پیاز Bulblet number	ماده خشک پیاز Bulb dry matter (%)	وزن تر پیاز Bulb fresh weight (g)	قطر پیاز Bulb diameter (mm)	تعداد پیاز Bulb number
مربع × ۶۵ بوته در هر متر مربع Square × 65 plantlet/m^2	33.71a	3.69c	19.13e	2.41a	24.45abc	23.51b	36.77bcd	1.58cd
مربع × ۴۵ بوته در هر متر مربع Square × 45 plantlet/m^2	34.57a	4.62b	21.77abc	2.08b	24.97c	23.03bc	37.51ab	1.50de
مربع × ۲۵ بوته در هر متر مربع Square × 25 plantlet/m^2	31.48b	4.00c	19.65de	2.58a	28.33ab	24.66a	37.57a	1.41e
مثلث × ۶۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 65 plantlet/m^2	35.26a	3.98c	21.33bc	1.91c	26.59bc	22.48cd	37.09abc	1.76a
مثلث × ۴۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 45 plantlet/m^2	31.41b	4.74ab	22.60ab	1.83c	30.04a	22.13de	37.10abc	1.58cd
مثلث × ۲۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 25 plantlet/m^2	31.61b	5.02a	22.97a	2.00bc	30.58a	21.56e	36.24d	1.41e
مستطیل × ۶۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 65 plantlet/m^2	28.26bc	4.68ab	21.38bc	2.50a	24.78c	22.24cde	36.19d	1.66bc
مستطیل × ۴۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 45 plantlet/m^2	29.62bc	4.47b	20.88cd	2.00bc	24.41c	22.35cde	36.51cd	1.75ab
مستطیل × ۲۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 25 plantlet/m^2	33.76a	4.03c	20.64cd	2.08b	29.55ab	21.63de	36.70cd	1.58cd

در هر ستون حروف مشترک عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

جدول ٦- اثر متقابل الگوی کاشت × تراکم گیاه روی صفات فیزیولوژیک گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng'

Table 6- The interaction effect of planting pattern ×plant density on the physiological traits of tulip (*Tulipa* L.) cv. 'Spryng'

تیمارها (الگوی کاشت × تراکم گیاه) Treatments (planting design × plant density)	کلروفیل کل Total chlorophyll (µg/ml)	کلروفیل a Chlorophyll a (µg.ml^{-1})	کاروتنوئید گلبرگ Petal carotenoid (µg.ml^{-1})	درصد ماده خشک گلبرگ Dry matter percentage of petal (%)	وزن تر گلبرگ Petal fresh weight (g)	درصد ماده خشک اندام هوایی Dry matter percentage of aerial organ (%)	وزن تر اندام هوایی Fresh weigh of aerial organ (g)
مربع × ۶۵ بوته در هر متر مربع Square × 65 plantlet/m^2	11.88ef	6.99bc	1.55ab	8.91c	9.31abc	10.81bc	35.47bc
مربع × ۴۵ بوته در هر متر مربع Square × 45 plantlet/m^2	12.57c	7.42b	1.68a	10.10a	9.16bcd	11.06a	34.57cd
مربع × ۲۵ بوته در هر متر مربع Square × 25 plantlet/m^2	11.73f	6.94c	1.52bc	8.90c	9.09bcd	10.30d	38.23a
مثلث × ۶۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 65 plantlet/m^2	12.91b	8.24a	1.23e	9.93a	8.79d	10.20d	33.85d
مثلث × ۴۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 45 plantlet/m^2	13.57a	7.98a	1.37cde	9.36b	9.69a	10.96ab	35.99b
مثلث × ۲۵ بوته در هر متر مربع Triangle × 25 plantlet/m^2	12.31cd	7.11bc	1.35de	9.23bc	9.42ab	9.95e	39.15a
مستطیل × ۶۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 65 plantlet/m^2	10.92g	6.38d	1.37cde	9.52b	8.95cd	10.72c	36.34b
مستطیل × ۴۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 45 plantlet/m^2	12.07de	6.86c	1.41bcd	8.98c	9.01cd	10.94ab	35.64b
مستطیل × ۲۵ بوته در هر متر مربع Rectangular × 25 plantlet/m^2	10.99g	6.19d	1.46bcd	9.18bc	9.60a	9.85c	38.33a

در هر ستون حروف مشترک عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

در پژوهش حاضر مشخص شد که تغییر فاصله و یا الگوی کاشت می‌تواند برخی ویژگی‌های پیاز و پیازچه لاله (مانند تعداد، قطر، وزن تر و درصد ماده خشک) را تحت تأثیر قرار دهد. این نتایج با گزارش جان و همکاران (Jhon *et al*., 2008) مطابقت دارد که نشان دادند تعداد و وزن پیاز و پیازچه لاله با افزایش تراکم افزایش یافت. وزن و تعداد پداژه در گلایول تحت تأثیر الگوی کاشت قرار گرفت (Singh, Daneshvar & Heidari, 2009;2002). رقابت برای دریافت نور حداکثری و فتوسنتز، عامل اصلی برای تغییر صفات مربوط به پیاز و پیازچه است. این رقابت تحت تأثیر آرایش کاشت و تراکم گیاه قرار دارد (Khalaj & Edrisi, 2013; Hocking, 1993). دهورتق و لنارد (De Hertogh & Le Nard, 1993) گزارش دادند که رشد و نمو گیاهان پیازی تحت تأثیر برخی عوامل محیطی مانند نور، درجه حرارت و رطوبت قرار می‌گیرد و احتمالاً رطوبت مهمترین عامل محیطی محسوب می‌شود. یکی از وظایف سوخ در گیاهان سوخ‌دار از جمله لاله، ذخیره آب است، بنابراین، می‌توان بیان کرد که تراکم کاشت روی دریافت نور بیشتر از رطوبت اثر می‌گذارد. البته، بایستی اهمیت الگوی کاشت از جنبه نور دریافتی توسط بوته‌ها مورد توجه بیشتری قرار گیرد. در پژوهش حاضر، بیشترین ماده خشک اندام هوایی و پیاز در تراکم ۴۵ بوته در هر متر مربع حاصل شد که نشاندهنده تراکم بهینه است، اما تراکم ۶۵ بوته از نظر تعداد پیاز برتر بود که امری طبیعی است. ماده خشک پیازچه در تراکم ۶۵ بوته در متر مربع در الگوهای کاشت مربع و مثلث در زمره تیمارهای برتر بودن که علت آن بیشتر ناشی از الگوهای کاشت مربع و مثلث است. این دو الگوی کاشت به‌ویژه مثلثی، رقابت نوری را کاهش می‌دهند. کاهش شدت نور علاوه بر کاهش شدت فتوسنتز، می‌تواند موجب ایجاد سایه و کاهش درجه حرارت در محیط اطراف بوته‌ها گردد. این کاهش شدت نور علاوه بر کاهش عملکرد در گیاهان پیازی، موجب کاهش اندازه پیاز می‌گردد (San-oh *et al*., 2006). به‌نظر می‌رسد یکی دیگر از دلایل تأثیر فاصله و تراکم کاشت، تأثیر بر رشد ریشه باشد. حینین و همکاران (Heinen *et al*., 2003) در تعیین مدل ریاضی مربوط به رشد ریشه گیاهان مختلف به این نتیجه رسیدند که نحوه گسترش ریشه‌ها تحت تأثیر عواملی مانند محیط رشد ریشه، نحوه به‌کارگیری کود و میزان آب قرار می‌گیرد و موارد ذکرشده پارامترهای اصلی هستند که می‌توانند مدل ریاضی تخمین رشد را تحت تأثیر قرار دهند.

اثر تراکم گیاه و الگوی کاشت بر صفات فیزیولوژیک

اثر تیمارهای مختلف تراکم گیاه و الگوی کاشت روی همه صفات فیزیولوژیک به غیر از کلروفیل b در سطح آماری یک درصد و برای کاروتنوئید در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). اثر متقابل تیمارهای تراکم گیاه و الگوی کاشت نشان داد که بیشترین وزن تر اندام هوایی (۳۹/۱۵ گرم) در تیمار الگوی مثلث و ۲۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. بیشترین ماده خشک اندام هوایی (۱۱/۰۶ درصد) و ماده خشک گلبرگ (۱۰/۱۰ گرم) و بالاترین میزان کاروتنوئید گلبرگ (۱/۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در آرایش کاشت مربع و تراکم ۴۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد (جدول ۶). بالاترین وزن تر گلبرگ (۹/۶۹ گرم) و بیشترین میزان کلروفیل کل (۱۳/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در الگوی مثلث و تراکم ۴۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد. وزن تر گلبرگ (۹/۶۰ گرم) در الگوی کاشت مستطیلی و تراکم ۲۵ بوته در هر متر مربع نیز بالا بود. بیشترین میزان کلروفیل a (۸/۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در الگوی مثلث و تراکم ۶۵ بوته در هر متر مربع به‌دست آمد (جدول ۴).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش تراکم کاشت منجر به کاهش وزن تر و افزایش درصد ماده خشک گردید. این نتایج با یافته‌های سامانی و همکاران (Samani *et al*., 1999) انطباق داشت. دئو و مارتین (Deo & Martin, 2000) نیز گزارش دادند که با افزایش تراکم، وزن خشک گیاه و گل همیشه‌بهار افزایش یافت. با افزایش تراکم، فضا برای رشد گیاه کاهش می‌یابد که خود باعث کاهش وزن تر گیاه و گل می‌شود (Hamidi *et al*., 2010). مستوفی‌پور و هاشم‌آبادی (Mostofipour & Hashemabadi, 2010) گزارش کردند که آرایش کاشت روی وزن همیشه‌بهار تأثیر داشت. آرایش کاشت مستطیل به علت کاهش تشعشع نور و رقابت شدید، رشد گیاه و ماده خشک بوته را کاهش داد. توزیع فضای گیاهان در یک جامعه گیاهی با جذب تشعشع در ارتباط است و این صفت نقش تعیین‌کننده‌ای در ظرفیت فتوسنتز و عملکرد گیاه دارد. در گل نرگس، افزایش تراکم کاشت منجر به افزایش وزن تر گل شد (Daneshvar & Heidari, 2011). در مرحله قبل از گلدهی، تأثیر شدت نور بر تأمین مواد فتوسنتزی برای سوخ‌های در حال رشد و یا شاخه‌های گل‌دهنده در طول دوره رشد مهم می‌باشد زیرا گل‌آذین-های در حال رشد و نمو برای دریافت این مواد با سوخ‌های در حال رشد رقابت می‌نمایند ولی پس از برداشت گل، شدت نور می‌تواند تولید مواد فتوسنتزی مورد نیاز برای ذخیره در سوخ را تحت تأثیر قرار دهد (Hocking, 1993). با توجه به اینکه رشد گیاه لاله در نیمه دوم سال انجام می‌گیرد که شدت نور در طول این دوره کاهش می‌یابد، احتمالاً شدت یا طول موج نور در تراکم‌های کاشت مختلف بر فتوسنتز گیاه لاله تأثیر داشته است. با توجه به اینکه در تعیین کیفیت ظاهری و ارزش اقتصادی گل لاله، علاوه بر قیمت و وضعیت کلی ظاهری گل، مواردی همچون رنگ گل نیز مهم می‌باشد، نتایج

آزمایش حاضر نشان داد که میزان کاروتنوئید گلبرگ تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار گرفت. بنابراین، این شاخص می‌تواند به عنوان معیاری مناسب جهت ارزیابی اثر الگو و تراکم کاشت بر کیفیت ظاهری گل پیشنهاد شود. نتایج این مطالعه با گزارش مستوفی‌پور و هاشم‌آبادی (Mostofipour & Hashemabadi, 2010) روی گل همیشه‌بهار هماهنگی دارد. این محققان نشان دادند که بیشترین میزان کاروتنوئید در طرح کاشت مربع حاصل شد که این امر مشخص می‌کند فضای یکنواخت بین بوته‌ها باعث افزایش کاروتنوئید در گیاه به علت پخش یکنواخت نور و همچنین دریافت نور بیشتر توسط برگ‌های پایینی گیاه شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش تراکم تا تعداد ۴۵ بوته در متر مربع منجر به افزایش میزان کلروفیل گردید، اما پس از آن روند کاهشی نشان داد. به نظر می‌رسد که دلیل این کاهش، ناشی از عوامل درونی گیاه بر اثر رقابت بوته‌ها برای جذب عناصر غذایی خاک است.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که تغییر الگوی کاشت می‌تواند تا حدی اثر تراکم کاشت را در گیاه لاله تحت تأثیر قرار دهد. افزایش تراکم کاشت تا ۴۵ بوته در متر مربع و الگوهای کاشت مثلث و مربع، منجر به افزایش معنی‌دار اکثر صفات مورد آزمایش و بهبود خصوصیات کمی و کیفی گل لاله (*Tulipa* L.) رقم 'Spryng' در شرایط آب و هوایی گیلان شد. در نتیجه، این تراکم و الگوهای کاشت قابل توصیه به تولیدکنندگان لاله این استان و استان‌های با شرایط آب و هوایی مشابه با استان گیلان می‌باشد.

References

1- Ali, A., Afzal, M., Rasool, I.J., Hussain, S., & Ahmad M. (2011). *Sunflower (Helianthus annuus L.) hybrids performance at different plant spacing under agro-ecological conditions of Sargodha, Pakistan*. In: International Conference on Food Engineering and Biotechnology, IACSIT Press, Singa*pore* 9, 317–322. https://www.academia.edu/92387895

2- Amjad, A., & Ahmad, I. (2012). Optimizing plant density, planting depth and postharvest preservatives for *Lilium longifolium*. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, *2*, 13–20. https://www.researchgate.net/publication/285675355

3- Baghdadi, A., Ridzwan, A.H., Nasiri, A., Ahmad, I., & Aslani, F. (2014). Influence of plant spacing and sowing time on yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *12*, 688–691. https://www.researchgate.net/publication/263279191

4- Bahar, S.N.G., & Korkut, A.B. (1998). Research on the effects of planting densities on the yield of corm and cormel in some gladiol (*Gladioulus* L.) varieties. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *22*, 51–58. https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/vol22/iss1/8

5- Balalić, I., Zorić, M., Branković, G., Terzić, S., & Crnobarac J. (2012). Interpretation of hybrid × sowing date interaction for oil content and oil yield in sunflower. *Field Crops Research*, *137*, 70–77. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.08.005

6- Beg, A., Pourdad, S.S., & Alpour, S. (2007). Row and plant spacing effect on agronomic performance of sunflower in warm and semi-cold areas of Iran. *Helia*, *30*, 99–104. https://doi.org/10.2298/HEL0747099B

7- Bhosale, A.B., Deshmukh, M.R., & Takte, R.L. (2012). Effect of different planting densities on performance of gerbera under polyhouse conditions. *The Asian Journal of Horticulture*, *7*, 449–453. Corpus ID: 127171956

8- Bijimol, G., & Singh, A.K. (2001). Effects of spacing and nitrogen on flowering and post-harvest life of gladiolus. *Journal of Applied Horticulture*, *3*, 48–50. https://www.sid.ir/paper/601689/en

9- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacqmard, A., Lejeune, P., Onckelen, H.V., Perilleux, C., & Bernier, G. (2003). Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal. Experimental Botany*, *54*, 2511–2517. https://doi.org/10.1093/jxb/erg276

10- Craine, J.M., & Dybzinski, R. (2013). Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Functional Ecology*, *27*, 833–840. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12081

11- Daneshvar, M.H., & Heidari, M. (2009). Effects of plant density and planting pattern on growth and flower characteristics of gladiolus. *Journal of Horticultural Science*, *23*(2), 32–40. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v1388i2.2566

12- Daneshvar, M.H., & Heidari, M. (2011). Effect of planting distance and cultivation depth on some quantitative traits of narcissus (*Narcissus tazetta* L.) cut flower in climatic conditions of Khouzestan (Mollasani). *Journal of Horticultural Science*, *25*(3), 304–309. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v1390i0.11337

13- De Hertogh, A., & Le Nard, M. (1993). *The physiology of flower bulbs*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. ISBN: 0444874984, 9780444874986

14- Ehsanzadeh, P., & Zarean Baghdadabadi, A. (2003). Effect of plant density on yield, yield components and some growth characteristics of two safflower cultivars in Isfahan climate. *Journal of Agricultural Science and Technology and Natural Resources*, *7*(1), 129–139. (In Persian with English abstract). https://dorl.net/dor/20.1001.1.22518517.1382.7.1.10.9
15- Ford, E.D. (2014). The dynamic relationship between plant architecture and competition. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 275. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00275
16- Ghannadi, F. (1992). *Growing Tulips*. Magda Press, Isfahan, p. 113. (In Persian)
17- Ghasemi Ghehsareh, M., & Kafi, M. (2009). *Practical and scientific floriculture*. Razavi Press, Isfahan, p. 313. (In Persian)
18- Ghobadi, M.E., & Ghobadi, M. (2010). The effects of sowing dates and densities on yield and yield components of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *International Scholarly and Scientific Research and Innovation*, *10*, 725–728.
19- Gomes, H.F., Vieira, M.C., & Heredia, Z.N.A. (2007). Density and plant arrangement on *Calendula officinalis* L. yield. *Revista Brasileira de Plants Medicinais*, *9*, 117–123.
20- Hamidi, A., Khodabandeh, N., & Mohammady-nasab, A.D. (2010). Plant density and nitrogen effects on some traits of maize (*Zea mays* L.). *Plant Ecophysiology*, *2*, 47–52.
21- Heinen, M., Mollier, A., & Willigen, P.D. (2003). Growth of a root system described as diffusion. II. Numerical model and application. *Plant and Soil*, *252*, 251–265. https://doi.org/10.1023/A:1024749022761
22- Hocking, P.J. (1993). Seasonal dynamics of the accumulation, distribution and redistribution of dry matter and mineral nutrients in a weedy species of gladiolus (*Gladiolus caryophyllaceus*). *Annals of Botany*, *71*, 495–509. https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1066
23- Ibrahim, H.M. (2012). Response of some sunflower hybrids to different levels of plant density. *APCBEE Procedia*, *4*, 175–182. https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.11.030
24- Jhon, A.Q., Mir, M.M., & Bhat, Z.A. (2008). Effect of planting time and density on growth and bulb production in tulip cv. Apeldoorn. *Indian Journal of Horticulture*, *65*(4), 466–470.
25- Kaya, Y., Jocić, S., & Miladinović, D. (2012). Sunflower. In: Gupta, S.K. (eds): Technological Innovations in Major World Oil Crops: Breeding. *Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York* 85–130. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0356-2
26- Khalaj, M.A., & Edrisi, B. (2013). Effect of nitrogen and plant spacing on nutrient uptake, quality and quantity characteristics of tuberose (*Polianthes tuberosa* L. 'Double'). *Journal of Horticultural Science*, *27*(1), 59–66. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.20791
27- Klasman, R., Molinari, J., Benedetto, A.D., & Benedetto, A. (1995). Greenhouse cultivation of gladiolus at four planting densities. *Horticultura Argentina*, *14*, 65–68.
28- Kumar, K., Singh, G.P., Singh, N., Bhatla, A.K., & Nehra, B.K. (2007). Performance of seed crop of coriander under different levels of row spacing, nitrogen and cycocel. *Haryana Journal of Horticultural Sciences*, *36*, 127–128.
29- Mane, P.K., Bankar, G.J., & Makne, S.S. (2007). Influence of spacing, bulb size and depth of planting on flower yield and quality of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cv. Single. *Indian Journal of Agriculture Research*, *41*(1), 71–74.
30- Martin, R.J., & Deo, B. (2000). Effect of plant population on *Calendula officinalis* flower production. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *28*(1), 33–44. https://doi.org/10.1080/01140671.2000.9514120
31- Mladenović, M., Cvejić, S., Jocić, S., Ćuk, N., Čukanović, J., Jocković, M., & Marjanović Jeromela, A. (2020). Effect of plant density on stem and flower quality of single-stem ornamental sunflower genotypes. *Horticultural Science (Prague)*, *47*(1), 45–52. https://doi.org/10.17221/10/2019-HORTSCI
32- Mojiri, A., & Arzani, A. (2003). Effects of nitrogen rate and plant density on yield and yield components of sunflower. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, *7*, 115–125. https://dorl.net/dor/20.1001.1.24763594.1382.7.2.9.5
33- Moosavi, S.G.R., Seghatoleslami, M.J., & Zareie, M.H. (2012). The effect of planting date and plant density on morphological traits and essential oil yield of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4, 496–501.
34- Moraes-Cerdeira, R.M., Burandt, C.L., Bastos, J.K., Nanayakkara, D., Mikell, J., Thurn, J., & McChesney, J.D. (1997). Evaluation of four *Narcissus* cultivars as potential sources for galanthamine production. *Planta Medica*, *63*(5), 472–474. https://doi.org/10.1055/s-2006-957740
35- Mostofipour, A.A., & Hashemabadi, D. (2010). *The effect of planting arrangement and different levels of potassium sulfate fertilizer on yield and quality of marigold flowers*. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Rasht, Iran. (In Persian)

36- Niknejad, M., & Yahya, A. (1994). *Introduction to Crop Yield Physiology*. Shiraz University Press. P. 570. (In Persian)
37- Parkash, J., Singh, N.P., & Sankaran, M. (2006). *Package of practices for tuberose cultivation in tripura*. ICAR Research Complex for NEH Region, Tripura Centre Publication No. 31.
38- Rajcan, I., & Swanton, C.J. (2001). Understanding maize-weed competition: resource competition, light qualiy and the whole plant. *Field Crops Research, 71*, 139–150. https://doi.org/10.4236/tel.2011.13018
39- Roghayeh, S.A., Ahmad, T., & Shahzad, J-e-S. (2012). Effect of plant density on phenology and oil yield of safflower herb under irrigated and rainfed planting systems. *Journal of Medicinal Plants Research, 6*, 2493–2503. https://doi.org/10.5897/JMPR12.004
40- Samani, M.R.K., Khajehpour, M.R., & Ghavaland, A. (1999). Effect of row spacing and plant density on growth and dry matter accumulation in comon on sfhan. *Iranian Journal of Agricultural Science, 29*, 667–679. https://doi.org/10.3390/agronomy13041117
41- San-oh, Y., Sugiyama, T., Yoshita, D., Ookawa, T., & Hirasawa, T. (2006). The effect of planting pattern on the rate of photosynthesis and related processes during ripening in rice plants. *Field Crops Research, 96*, 113–124. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.06.002
42- Sharma, J.R., & Gupta, R.B. (2003). Effect of corm size and spacing on growth, flowering and corm production in gladiolus. *Journal of Ornamental Horticulture, 6*, 352–356.
43- Sher, A., Khan, A., Ashraf, U., Liu, H.H., & Li, J.C. (2018). Characterization of the effect of increased plant density on canopy morphology and stalk lodging risk. *Frontiers in Plant Science, 9*, 1047. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01047
44- Singh, A.K. (2006). *Flower Crops, Cultivation and Management*. New India Publishing Agency. New Delhi. 463 p.
45- Singh, A.K., Singh, N.P., & Singh, V.B. (2001). Effect of time, spacing and depth of planting on gladiolus. *Indian Journal of Hill Farm, 14*, 128–131.
46- Singh, K.P. (2002). Effect of planting methods and earthing on gladiolus. *Annals of Agricultural Research, 23*, 7230–7235.
47- Süzer, S. (2011). Effects of nitrogen and plant density on dwarf sunflower hybrids. *Helia, 33*, 207–214. https://doi.org/10.2298/HEL1053207S
48- Vaziri, R., Biabani, A., Azizy, M., Gholizadeh, A.Gh., & Mahdavi, A.R. (2010). Investigate effects plant density and different fertilizer rates on the agronomic characteristics and yield of tobacco (var. K326). *Crop Plants Production, 30*(4), 205–215 (In Persian with English abstract)

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 493-508

Symbiosis of Algal Endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 with Mexican Lime Seedlings under Salinity Stress Condition

L. Baghazadeh Daryaii[1], D. Samsampour[2*], A. Bagheri[3], J. Sohrabipour[3]

1 and 2- Ph.D. in Horticultural Science and Associate Professor, Agriculture and Natural Resources College, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Samsampoor@hormozgan.ac.ir)
3- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Bandar Abbas, Iran

Received: 24-10-2021
Revised: 02-05-2024
Accepted: 12-05-2024
Available Online: 16-05-2024

How to cite this article:
Baghazadeh Daryaii, L., Samsampour, D., Bagheri, A., & Sohrabipour, J. (2024). Symbiosis of algal endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 with Mexican lime seedlings under salinity stress condition. *Journal of Horticultural Science, 38*(3), 493-508. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.73232.1101

Introduction

Endophytes have symbiosis life within the plant tissues without causing any obvious negative effects. Seaweeds are one of the large and diverse groups of marine plants that play an essential role in marine and oceans ecosystems. Seaweeds show rich diversity of associated microorganisms in compare with the other multicellular organisms. Citrus species, are amongst the most important evergreen fruit trees, cultivated in many countries worldwide. There are several obstacles for citrus production in southern of Iran, limiting continuity of citrus production. Lack of suitable soil, salinity and drought stresses are the main challenges threatening citrus industry in southern of Iran. Similar to other citrus species, the production of Mexican lime is threatened by certain biological stresses (such as pests, plant diseases and weeds) and non-biological stresses (such as salinity, drought, floods, cold and heat stress). Endophytes are advantageous group of microorganisms that protect plants from biotic and abiotic stresses. One of the alternative ways to restore normal plant growth may be to use plant growth to stimulate endophytes. Endophytes can play an important role in plant growth. Endophytes from marine environment are gaining special interest because of their existence in the harsh conditions of marines and ocean ecosystem such as temperature, light availability, high salinity and osmotic stress. Endophytes have already been isolated from various marine habitat, including marine plants, marine invertebrates and vertebrates. Among these organisms, seaweeds are one of the most prevalent sources of marine-derived fungi and bacteria for chemical studies. The purpose of this study was the isolation of associated fungi and bacteria endophytes with seaweed species in Persian Gulf to investigate morphological and molecular characterization by using PCR amplifications ITS1-5.8S-ITS4 regions and 16s rRNA gene respectively. Here, we have evaluated the potential of inoculating Mexican lime seedlings with seaweeds fungi and bacteria endophyte combination, (*Aspergillus niger*+ *Bacillus aquimaris* OD14), to improve morphological, biochemical, antioxidant and photosynthesis pigments characterizes of Mexican lime in salinity condition.

Materials and Methods

The main aim of this study was to investigate the role of endophytic fungi (*Aspergillus niger*) and bacteria (*Bacillus aquimaris* OD14) in improving the growth of Mexican lime seedlings. The seaweed samples were collected from coastal regions of Bushehr province and Qeshm Island. Fungi and bacteria endophytes were isolated and identified base on morphological and molecular methods. Molecular characterization was investigated using PCR amplification of ITS1-5.8S-ITS4 regions and 16s rRNA gene respectively. Mexican lime seeds were sterilized with 0.5% sodium hypochlorite for 20 minutes and then completely distilled three times with distilled water.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.73232.1101

Seedlings pots containing autoclaved soil were placed in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Hormozgan University. The experiment was arranged as a factorial experiment based on randomized complete randomize design with three replications. Isolated fungi and bacteria by MT420720 and MT278260 accession numbers were used in eight months old Mexican lime seedlings. The suspension was adjusted to a concentration of 1×10^6 cell per ml for fungi and 1×10^8 cell per ml for bacteria inoculums. For better contact of seedlings with endophytes, inoculation was performed three times. After three months, salinity stress was applied. morphological (Leave, Stem and Root dry and fresh weight), biochemical (Protein, MDA and soluble sugars), antioxidant capacity (CAT, POD, SOD, APX and Gr activity) and photosynthesis pigments (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll and Carotenoids) characteristics in treated Mexican lime seedlings and control were analyzed. Analysis of variance of traits was performed using SAS software version 9.4 and the means were compared using LSD method with a probability level of $P\leq0.05$.

Results and Discussion

The results show that most characterizes were significant compare with control. For example, in 6000 µs/cm water salinity, leave fresh weight (203.49%), root fresh weight (347.41%), stem fresh weight (206.81%) and root dry weight (421.95%) were significantly higher compared with control ($P>0.001$). Endophytes inoculation can significantly improve photosynthesis pigments such as chlorophyll a (65.21%), chlorophyll b (11.9%), total chlorophyll (28.39%) and carotenoids (59.09%) ($P>0.001$) compare with control. In antioxidant capacity of seedling, CAT, POD, SOD, Gr and APX were analyzed, Endophytes can increase enzymes activity. For biochemical characterizes, in 6000 µs/cm water salinity, endophytes can significantly increase soluble sugars (17.85%) and decrease MDA (35.18%) in inoculated seedlings compare with control ($P>0.001$).

Conclusion

The results showed that the use of endophytic fungi and bacteria can increase the growth of Mexican lime seedlings under salinity stress. Thereby it can be used as an effective tool for growing salinity-sensitive plants in saline conditions.

Keywords: Abiotic stresses, Antioxidant capacity, Endophytic microorganisms, Glutathione reductase, Seaweeds

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۴۹۳-۵۰۸

اثر همزیستی اندوفیت‌های *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 با دانهال‌های مکزیکن لایم تحت شرایط تنش شوری

لیلا بقازاده دریایی[۱]- داود صمصام‌پور[۲*]- عبدالنبی باقری[۳]- جلوه سهرابی‌پور[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۳

چکیده

رشد و عملکرد گیاهان به‌سبب تنش‌های زنده و یا غیر زنده متعدد محدود می‌شود. در سال‌های اخیر، افزایش خشکی و خشکسالی در ایران روی کیفیت آب آبیاری تأثیرگذار بوده و آن‌را به سمت شور شدن سوق داده است. میکروارگانیسم‌های اندوفیت نقش مهمی در محافظت از گیاهان میزبان خود در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند. در این مطالعه، از ترکیب اندوفیتی قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی OD14 *Bacillus aquimaris* همزیست با جلبک دریایی، به‌ترتیب در غلظت‌های ۱×۱۰^{۶} سلول در یک میلی‌لیتر و ۱×۱۰^{۸} سلول در یک میلی‌لیتر، به‌منظور ارتقاء تحمل دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم نسبت به تنش شوری استفاده شد. اندوفیت قارچی و باکتریایی بر اساس مورفولوژیک و مولکولی (به‌ترتیب بر پایه تکثیر نواحی ITS1 و ITS4 و ژن 16s rRNA) با استفاده از تکنیک PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. تلقیح در مرحله هشت ماهگی دانهال‌ها انجام و پس از گذشت سه ماه، تنش شوری صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر به‌صورت مرحله به مرحله اعمال شد. پس از هشت هفته، صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی دانهال‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان دادند، اکثر صفات مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت باعث افزایش وزن تر و خشک ساقه (به‌ترتیب ۲۰۶/۸۱ و ۲۰۲/۳۸ درصد)، وزن تر و خشک برگ (به‌ترتیب ۲۰۳/۴۹ و ۸۷۰/۵۸ درصد) و وزن تر و خشک ریشه (به‌ترتیب ۳۴۷/۴۱ و ۴۲۱/۹۵ درصد) نسبت به شاهد شد. ترکیب اندوفیتی توانسته بود سطح رنگدانه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل a (۶۵/۲۱ درصد)، کلروفیل b (۱۱/۹ درصد) و کاروتنویدها (۵۹/۰۹ درصد) را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دهد. در بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دانهال‌ها در بالاترین سطح شوری، ترکیب اندوفیتی توانسته بود باعث روند افزایشی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاتالاز (۱۴۱/۸۴ درصد)، پراکسیداز (۶۶/۸ درصد)، سوپراکسید دیسموتاز (۶۰/۰۱ درصد)، گلوتاتیون ردوکتاز (۲۳۲/۴۱ درصد) و اسکوربیک پراکسیداز (۲۴/۸۸ درصد) نسبت به شاهد شود. همچنین، ترکیب اندوفیتی توانست باعث کاهش معنی‌دار مالون دی آلدئید (۳۵/۱۸ درصد) و افزایش قندهای محلول (۱۷/۸۵ درصد) و پروتئین کل (۲۲/۶۲ درصد) در دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد شود. به‌طور کلی، اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی همزیست با ماکروجلبک‌ها می‌توانند به‌عنوان گزینه مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی از جمله شوری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: تنش‌های غیرزیستی، جلبک‌های دریایی، ظرفیت آنتی اکسیدانی، گلوتاتیون ردوکتاز، میکروارگانیسم‌های اندوفیت

مقدمه

در بسیاری از مناطق دنیا، رشد و عملکرد گیاهان به سبب تنش‌های متعدد محدود می‌شود. گیاهان مجبور به تحمل و مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی هستند که این امر خود باعث افزایش متابولیت‌ها و بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌گردد (Khan *et al.*, 2017).

امروزه، شوری آب و خاک مورد استفاده در کشاورزی یکی از بزرگترین مسایلی است که بشر با آن روبروست. در بررسی‌ها بیان

۱ و ۲- به‌ترتیب دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Samsampoor@hormozgan.ac.ir)
۳- استادیار گروه تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.73232.1101

شده است که ۱۲ میلیون هکتار از اراضی قابل کشت به‌دلیل شوری از بین رفته‌اند و این آمار رو به افزایش است (FAO, 2015). نیاز روز افزون به فرآورده‌های کشاورزی از یک سو و کمبود منابع آب مناسب در بیشتر نقاط کشور به‌ویژه در مناطق خشک از سوی دیگر، سبب شده، بهینه‌سازی مصرف آب در سر لوحه کار برنامه‌ریزان و سیاست-گزاران قرار گیرد.

گیاهان عموما به‌وسیله مکانیسم‌های دفاعی و تنظیم متابولیسم های سلولی، به تنش‌های محیطی عکس‌العمل نشان می‌دهند (Heidarvand & Amiri, 2010). این مکانیسم‌ها، سبب تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی می‌شود. در شرایط تنش، طی کاهش فتوسنتز و افزایش انرژی متابولیسمی در گیاه، اکسیدان‌هایی (ROS) از قبیل H_2O_2، O_2، O^{2+} و OH تولید می‌شوند. اکسیدان‌ها، در غلظت‌های پایین، نقش محرک‌های سیگنالی دارند، اما در غلظت های بالاتر، باعث صدمات اکسیداتیو و تأثیر بر لیپیدهای غشاء، نوکلئوتید اسیدها و پروتئین‌ها می‌شوند (Del Rio, 2015). تنش شوری با تأثیر بر تعادل جذب عناصر غذایی و افزایش فشار اسمزی منفی در سلول‌های گیاهی به‌شدت سلامت وعملکرد گیاه را تحت تأثیر قرارمی‌دهد (Yaish *et al.*, Yaish & Kumar, 2015 ;2015).

تاکنون، از روش‌های فیزیکی و شیمیایی متعددی برای کاهش اثرات مخرب تنش شوری و افزایش مقاومت گیاهان، مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از روش‌های سنتی و اصلاحی گیاهان اگرچه پیشرفت‌های چشمگیری داشته است، اما موفقیت اندکی در ایجاد تحمل شوری در گیاهان داشته‌اند (Munns &Tester, 2008 ; Joshi *et al.*, 2015 Dood & Perez-Alfocea, 2012; ;Krishna *et al.*, 2015).

یکی از منابع مهم درآمد در بسیاری از کشورهای دنیا، تولید و پرورش مرکبات می‌باشد. مرکبات نقش مؤثر و مهمی را در اقتصاد این کشورهای تولید کننده ایفا می‌کنند. تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی، معزلی است که تولید مرکبات و به دنبال آن، بازارهای جهانی این محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در کشور ما نیز تولید مرکبات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و افراد بسیاری هستند که از تولید و فروش محصولات مرکبات امرار معاش می‌کنند. خشکی و شوری، از متداول‌ترین و در عین حال مهم‌ترین تنش‌های غیر زنده در رشد و پرورش گیاهان از جمله مرکبات می‌باشد. این تنش‌ها هر ساله خسارت قابل توجهی را در تولید و پرورش مرکبات در کشورهای مرکبات خیز از جمله ایران، وارد می‌آورند (Al-Yassin, 2005).

در مسیر کشاورزی پایدار، استفاده از میکروارگانیسم‌های اندوفیت به‌عنوان کودهای زیستی، باعث افزایش عملکرد و رشد گیاه می‌شوند و اثرات مخرب زیست‌محیطی را ندارند (Li, 2008)، علاوه‌براین، سلامت خاک بیشتر حفظ خواهد شد و روشی مقرون به‌صرفه می‌باشد (Pal *et al.*, 2015). اندوفیت‌ها می‌توانند با ایجاد همزیستی با گیاه میزبان، باعث افزایش رشد گیاه و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش-هاشوند (Saravanakumar & Samiyappan, 2007). این روش نسبت به روش‌های اصلاحی پیشین کم هزینه‌تر بوده و نتیجه کار زودتر آشکار می‌شود (Berg, 2009). اندوفیت‌های به‌دست آمده از محیط‌های دریایی، بدون این که به میزبان خود خسارتی وارد نمایند در بافت درونی میزبان خود زندگی می‌کنند و باعث تولید ترکیبات فعال زیستی می‌شوند که ارزش دارویی دارند (Strobel *et al.*, 2004 ;Strobel & Daisy, 2003).

ماکروجلبک‌های دریایی، به‌عنوان یک گروه گسترده از موجودات ماکروسکوپی شناخته می‌شوند که دارای ارزش غذایی بالایی مانند پروتئین‌ها، اسیدآمینه‌های ضروری (Mišurcová *et al.*, 2014 ; Volkmann *et al.*, 2008)، ویتامین‌ها، مواد معدنی می‌باشند و به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست فعال، از آن‌ها برای تولید ترکیبات دارویی استفاده می‌شود (MacArtain *et al.*, 2007).

اندوفیت قارچی *A. niger* و باکتری‌های جنس *Bacillus* از مهم ترین و اصلی‌ترین جنس‌های استخراج شده از اکوسیستم‌های دریایی و ماکروجلبک‌ها می‌باشند. اکثر متابولیت‌های حاصل از اندوفیت‌های قارچی دریایی، از جنس *A. niger* بوده است. این جنس قارچ، تحمل بالایی نسبت به غلظت‌های مختلف کلرید سدیم موجود در محیط کشت حاوی نمک از خود نشان داده است (Peng *et al.*, 2016).

فلولینگ و همکاران (Flewelling *et al.*, 2015)، ۱۰۰ گونه جلبک را از کشورهای مختلف جمع‌آوری نمودند و قارچ‌های اندوفیت آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. تاثیر اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به اثبات رسیده است. یاییش و همکاران (Yaish *et al.*, 2015)، اندوفیت‌های باکتریایی از ریشه درخت خرما جداسازی و شناسایی نمودند. بسیاری از این جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم ACC دمیناز، آمونیوم، هورمون رشد گیاهی IAA توانایی کلاته کردن آهن و قابل جذب نمودن پتاسیم، روی و کلسیم بودند. اندوفیت قارچی *Paecilomyces formosus* LHL10، باعث افزایش طول شاخساره گیاه تلقیح شده تحت شرایط تنش شوری شد که این تغییرات می‌تواند در اثر تجمع پرولین، افزایش آنتی‌اکسیدانت‌ها، حفظ پتانسیل آب برگ گیاه و کاهش نشت یونی به‌دست آید (Khan *et al.*, 2012).

استان هرمزگان دارای استعداد ویژه‌ای برای پرورش مرکبات می باشد و بخش اعظمی از باغ‌های استان به کشت مرکبات اختصاص داده شده است. مرکبات و به‌ویژه لیموترش رقم مکزیکن لایم، گیاهان حساس به شوری می‌باشند. شوری باعث کاهش رشد و عملکرد مرکبات می‌شود (Ennab, 2016). با توجه به کمبود آب و شور شدن آب مزارع و باغات استان، پژوهش حاضر در زمینه جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های همزیست با جلبک و استفاده از آن‌ها جهت افزایش تحمل به شوری در دانهال لیموترش رقم مکزیکن لایم انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه هرمزگان به اجرا در آمد. تیمارها شامل دو عامل شوری و اندوفیت بودند. عامل شوری، شامل چهار سطح کلرید سدیم (صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر) و عامل اندوفیت، شامل ترکیب اندوفیت های قارچی و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 و *Aspergillus niger* بودند که به‌منظور ایجاد تحمل به تنش شوری در دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم مورد استفاده قرار گرفتند. اندوفیت باکتریایی از جلبک *Rosenvingea orientalis* جمع‌آوری شده از جزیره قشم و اندوفیت قارچی از جلبک *Cladophoropsis* sp. جمع‌آوری شده از بوشهر استخراج شدند. قبل از تلقیح، جدایه‌ها در محیط‌های کشت PDA و NA حاوی غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (۱، ۲ و ۳ مولار) کشت شدند و میزان تحمل به نمک در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مایه‌زنی اندوفیت‌ها طی سه مرحله انجام شد. میزان تراکم سلولی باکتری‌ها 1×10^{8} سلول در یک میلی-لیتر محیط مایع و تراکم اسپورهای قارچی 1×10^{6} سلول در یک میلی‌لیتر محیط مایع در نظر گرفته شد (Ali *et al*., 2017).

استخراج اندوفیت‌ها

نمونه‌های جلبک به‌خوبی با آب شهری شستشو داده شدند تا هر گونه آلودگی سطحی و اگزوفیت‌ها از آن‌ها جدا شود. نمونه‌ها برای ۵ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور و بلافاصله به‌مدت ۱۰ ثانیه در آب مقطر استریل قرار گرفتند. پس از خروج از آب مقطر استریل، روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا آب اضافی آن‌ها گرفته شود. سپس به‌وسیله اسکالپل استریل به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری بریده و برای کشت مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج اندوفیت‌های قارچی از محیط‌کشت PDA استفاده شد. برای استخراج اندوفیت‌های باکتریایی از محیط‌کشت NA استفاده شد. نمونه شاهد، از آب مقطر استریل که برای استریل نمودن نمونه استفاده شده بود، روی محیط کشت چکانده شد تا از روش استریل کردن نمونه‌های جلبک و نیز از استریل بودن محیط آزمایشگاه اطمینان حاصل شود. پتری‌دیش‌های کشت جلبک‌ها به‌خوبی با پارافیلم بسته و به‌مدت چهار هفته در انکوباتور با شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی انکوبه شدند (Suryanarayanan *et al*., 2010).

تهیه بذر و آماده‌سازی دانهال‌ها

کشت بذور لیمو ترش رقم 'مکزیکن لایم' در تاریخ ۱۳۹۷/۶/۱۰ در گلخانه دانشگاه هرمزگان انجام شد. میوه‌های رسیده لیموترش رقم 'مکزیکن لایم' از باغ‌های لیموترش شهرستان رودان در شرق استان هرمزگان خریداری شدند. بذور میوه‌ها با قارچ کش بنومیل ۱/۵ در هزار ضدعفونی شدند. کشت بذور در سینی کشت در بستر کشت پیت ماس اتوکلاو شده انجام شد. از کودهای ۲۰:۲۰:۲۰ (N.P.K) هفته‌ای یک‌بار استفاده شد. سینی‌ها در شرایط نیمه سایه قرار داده و یک روز در میان آبیاری شدند. برای تهیه خاک گلدان‌ها، ماسه بادی، پیت ماس و کود پوسیده دامی به‌ترتیب به نسبت‌های ۲: ۲: ۱ با هم به-خوبی مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. دانهال‌ها در مرحله چهار برگی به گلدان‌های اصلی منتقل شدند. آبیاری هفته‌ای سه بار انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه نگهداری شدند تا دانهال‌ها به رشد مناسب برای تلقیح اندوفیت برسند. دانهال‌های هشت ماهه مکزیکن لایم به‌عنوان گیاه میزبان و حساس به شوری انتخاب شدند.

ظرفیت زراعی بستر کشت (SWG)

برای اندازه‌گیری ظرفیت زراعی، ابتدا گلدان‌ها کاملا آبیاری و سپس وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. گلدان‌ها به‌مدت سه روز در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه آون خشک و سپس توزین شد. برای محاسبه ظرفیت زراعی گلدان‌ها از فرمول زیر استفاده شد (Meggio *et al*., 2014).

$$SWG = \left[\frac{FW - DW}{DW}\right] \times 100$$

که در این معادله، FW وزن تر خاک و DW وزن خشک خاک می‌باشد. به‌منظور کاهش تنش و کاهش صدمات به گیاه، اعمال تنش شوری مرحله به مرحله انجام شد. در هفته اول به‌جز شاهد، همه گلدان‌ها با آب شور با هدایت الکتریکی ۲۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی متر آبیاری شدند. سپس در هفته دوم، شوری با هدایت الکتریکی ۴۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر نیز اضافه شد. در نهایت در هفته سوم، شوری با هدایت الکتریکی ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر نیز اعمال شد.

شاخص‌های مورفولوژیک

پس از چهار هفته بعد از اعمال تنش شوری، نمونه‌برداری دانهال‌ها انجام گرفت. برای اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک، صفاتی چون، وزن تر و خشک برگ، ساقه و ریشه، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن خشک، نمونه‌ها در دستگاه آون با ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان رسیدن به وزن ثابت قرار داده و سپس دوباره توزین شدند.

رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای بررسی رنگدانه‌های برگ، ۰/۲ گرم برگ تازه گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. محلول حاصل به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل CECIL, CE2501, 2000 series ساخت کشور انگلستان) با سه طول موج ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد.

اعداد به‌دست آمده در فرمول ذیل قرار داده شدند و میزان کلروفیل a، b و کل موجود در برگ محاسبه شد.

Chl_a (mg g^{-1}) = [(12/7×A_{663}) - (2/6×A_{645})] × ml acetone / mg leaf tissue

Chl_b (mg g^{-1}) = [(22/9×A_{645}) - (4/68×A_{663})] × ml acetone / mg leaf tissue

(8.02×A_{663})] × ml + Chl_T (mg g-1) = [(20.2×A_{645}) acetone / mg leaf tissue

برای محاسبه میزان کاروتنوئیدهای برگ از فرمول زیراستفاده شد (Arnon, 1949).

C_{x+c} =1000A_{470} -1.90Chl_a - 63/14Chl_b / 214, (x = xanthophylls and carotenes)

صفات بیوشیمیایی

محتوی نسبی آب برگ

برای اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ، ابتدا برگ‌ها با آب مقطر شستشو داده و سپس پنج دیسک هم اندازه از آن‌ها تهیه شد. دیسک‌ها توزین و به درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و به‌مدت چهار ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. دیسک‌ها آبگیری و توزین شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه اون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. دیسک‌های خشک شده دوباره با استفاده از ترازوی حساس توزین شدند. درنهایت، سه وزن حاصل برای محاسبه محتوی نسبی آب برگ نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر مورد استفاده قرار گرفتند (Morgan, 1984).

$$\text{محتوی نسبی آب} = \frac{(\text{وزن تازه} - \text{وزن خشک})}{(\text{وزن آبگیری} - \text{وزن خشک})} \times 100$$

پروتئین کل برگ

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کل برگ، ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از برگ در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج به‌خوبی ساییده شد. ترکیب به‌دست آمده به تیوپ‌های دو میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای تهیه معرف برادفورد، ۱۰۰ میلی‌گرم کومایسین بلو G250 (۰/۱ گرم)، در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد. پس از خنک شدن محلول، ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵ درصد به‌تدریج به محلول اضافه و سپس با آب مقطر حجم محلول به یک لیتر رسانده شد. درون یک فالکون ۱۰ میلی‌لیتری، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی به آن اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول واکنش در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1979).

قند کل محلول

برای سنجش قندهای کل محلول، از ۱۰۰ میلی‌گرم (۰/۱ گرم) برگ خشک شده استفاده شد. برگ‌های توزین شده درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و به آن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و به‌مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت یک هفته، ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی آن‌ها درون فالکون دیگر ریخته و با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده و یک میلی‌لیتر فنول ۵ درصد به آن اضافه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ به مواد درون فالکون اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه ترکیب حاصل در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (Kochert, 1978).

مالون دی آلدئید

برای سنجش مالون‌دی‌آلدئید، از دو ماده TCA (تری کلرو استیک اسید) و TBA (تیو باربیوتیک اسید) به‌عنوان دو ماده اصلی واکنش استفاده شد. ۰/۲ گرم از برگ فریز شده در چهار میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد TCA به‌خوبی ساییده شد. مخلوط حاصل به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای انجام واکنش، ابتدا دو محلول TCA ۲۰ درصد و TBA ۰/۵ درصد آماده شدند. دو میلی‌لیتر از آن به‌همراه دو میلی‌لیتر از محلول TCA ۲۰ درصد به‌درون یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس یک میلی‌لیتر از عصاره آماده شده در مرحله قبل به این دو محلول اضافه و به حمام بن ماری با دمای ۹۵

درجه سانتی‌گراد منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سریعا در حمام آب سرد خنک شدند. فاز رویی در طول موج ۵۳۲ خوانش شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل (ضریب شکست MDA معادل $۱۵۵\frac{1}{mM\ cm}$ است) استفاده شد (Hodges *et al.*, 1999).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای تهیه عصاره آنزیمی، به ۰/۲ گرم از برگ‌های فریز شده، یک میلی‌لیتر از بافر استخراج سرد اضافه و به‌خوبی ساییده شد. تیوپ‌های دو میلی‌لیتری حاوی عصاره، به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین که حاوی عصاره آنزیمی بود به تیوپ جدید منتقل شد و برای خوانش آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD EC 1. 11. 1.7)

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، یک میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات با ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و در فواصل ۱۰ ثانیه به‌مدت یک دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Chance & Maehly, 1955).

فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز (APX EC 1. 11. 1. 11)

جهت خوانش فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری اسکوربات اضافه و پس از یک دقیقه زمان، میزان جذب واکنش انجام شده در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد آنزیمی مساوی با تجزیه یک میلی مولار اسکوربیک در هر دقیقه می‌باشد (Nakano & Asada, 1981).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1)

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با کمک مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد.

بافر (۱): ال-متیونین ۱۳ میلی‌مولار و NBT ۷۵ میلی‌مولار تهیه شد.

بافر (۲): به ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم، ۰/۰۰۱ گرم ریبوفلاوین افزوده شد (۴ میکرومولار).

دو میلی‌لیتر از محلول واکنش با ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی مخلوط شد. محلول به‌مدت ۸ دقیقه در شرایط روشنایی لامپ ۴۰ وات قرار داده شد. سپس در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. همچنین برای سنجش فعالیت آنزیم از نمونه شاهد روشنایی نیز استفاده شد. در نمونه شاهد، به‌دلیل عدم وجود آنزیم گیاهی، احیای کامل نیتروبلوتترازولیوم انجام خواهد گرفت و به فورمازون تبدیل می‌شود. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنایی برای محاسبه فعالیت آنزیمی استفاده شد (Becana *et al.*, 1986).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR, EC 1.6.4.2)

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز، ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، DTNB ۰/۷۵ میلی‌مولار، NADPH ۰/۱ میلی‌مولار و GSSG یک میلی‌مولار تهیه شد. برای ایجاد مخلوط واکنش، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول DNTB، ۵۰ میکرولیتر از محلول NADPH، ۵۰ میکرولیتر محلول GSSG، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. GSSG در آخر به مخلوط واکنش اضافه شد. پس از اضافه کردن این ماده، جذب واکنش بعد از سه دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. برای حل شدن ماده DTNB از مگنت و هیتر با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. ضریب شکست TNB ($۱۴/۱۵\frac{1}{M\ cm}$) است که برای محاسبه فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز، از میلی‌مول TNB در دقیقه در گرم وزن تازه برگ بیان می‌شود (Smith *et al.*, 1988).

سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT EC 1. 11. 1.6)

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به یک میلی‌لیتر محلول سنجش اضافه و میزان فعالیت آنزیمی آن در زمان‌های صفر و هر ۲۰ ثانیه تا رسیدن به ۶۰ ثانیه (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ثانیه)، در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد آنزیمی کاتالاز برابر است با تجزیه یک مولار پراکسید هیدروژن در هر دقیقه، ضریب خاموشی در این واکنش $۴۰\ mM.cm^{-1}$ می‌باشد (Dhindsa *et al.*, 1981).

تجزیه و تحلیل آماری

تیمار دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم با اندوفیت و تنش شوری آب، با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ($P\leq0.05$) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

صفات رشدی گیاه

اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمار شوری و اثر متقابل شوری و اندوفیت بر صفات وزن تر و خشک ساقه، برگ و ریشه در سطح ۰/۱ و ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۱). با این حال، در اثر متقابل شوری و اندوفیت، بر وزن خشک ریشه و نسبت وزن تر به وزن خشک ساقه، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان دادند، در نمونه‌های شاهد، با افزایش درجات شوری، مقادیر وزن تر و خشک اندام‌ها کاهش پیدا کرده است. این در حالی بود که، در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت باعث افزایش وزن تر و خشک ساقه (به‌ترتیب ۲۰۶/۸۱ و ۲۰۲/۳۸ درصد)، وزن تر و خشک برگ (به‌ترتیب ۲۰۳/۴۹ و ۸۷۰/۵۸ درصد) و وزن تر و خشک ریشه (به‌ترتیب ۳۴۷/۴۱ و ۴۲۱/۹۵) نسبت به نمونه شاهد شد (جدول ۲). در دانهال‌های تلقیح شده، حتی در سطوح شوری بالاتر، افزایش معنی‌دار در بیومس گیاه مشاهده شد. تنش شوری بر فعالیت‌های متابولیکی گیاه از جمله تقسیم سلولی تأثیرگذار بوده و باعث کاهش تقسیم سلول‌های جدید می‌شود. کاهش تقسیم سلولی می‌تواند در اثر جذب عناصر سمی مانند سدیم نیز اتفاق افتد که باعث ضخیم شدن دیواره سلولی و کاهش تقسیم سلولی و کاهش رشد شاخساره و ریشه می‌شود. تلقیح ترکیب اندوفیتی باکتریایی و قارچی، باعث افزایش تحمل دانهال‌ها نسبت به شوری و کاهش معنی‌دار اثرات سوء ناشی از تنش نسبت به نمونه‌های شاهد شد (Sadeghi *et al*., 2020).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، در مقدار کلروفیل‌های برگ، کاروتنوئیدها و سطوح شوری در سطح ۰/۱ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. اثر متقابل شوری و اندوفیت بر کلروفیل a، b، (در سطح ۰/۱ درصد) کل و کاروتنوئیدها (در سطح ۵ درصد) معنی‌دار شدند. در بالاترین سطح شوری، ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی توانست باعث افزایش ۶۵/۲۱ درصدی کلروفیل a، ۱۱/۹ درصدی کلروفیل b، ۲۸/۳۹ درصدی کلروفیل کل و ۵۹/۰۹ درصدی کاروتنوئیدها نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

افزایش شوری باعث کاهش کلروفیل در تمام سطوح شوری شد. نتایج نشان دادند، همبستگی منفی بین سطوح شوری و مقادیرکلروفیل‌ها وجود دارد. شوری بر انتقال الکترون‌های فتوسنتزی تأثیر گذاشته و از فعالیت حداکثری فتوسیستم دو جلوگیری می‌کند. افزایش جذب یون‌های مضر همچون سدیم در اثر افزایش تنش شوری، باعث کاهش جذب عناصر ضروری در ساخت کلروفیل مانند منیزیم، فسفر و آهن می‌شود (Auge *et al*., 2001). کاهش مقدار کلروفیل سبب کاهش مقدار فتوسنتز خواهد شد. کاهش فتوسنتز باعث کاهش رشد گیاه می‌شود. در تحقیقات جوگاوات و همکاران (Jogawat *et al*., 2013) نیز مشاهده شد که استفاده از قارچ *P. indica* توانسته بود باعث افزایش میزان کلروفیل‌های a، b، کل و کاروتنوئیدها در گیاه میزبان شود.

جدول ۱- تجزیه واریانس تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی بیومس دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 1- ANOVA for the effect of *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the biomass of Mexican lime seedlings in the salinity condition

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	نسبت وزن تر به وزن خشک ساقه S.F.W/S.D.W	وزن خشک ساقه S.D.W	وزن تر ساقه S.F.W	نسبت وزن تر به وزن خشک ریشه R.F.W/R.D.W	وزن خشک ریشه R.D.W	وزن تر ریشه R.F.W	نسبت وزن تر به وزن خشک برگ L.F.W/L.D.W	وزن خشک برگ L.D.W	وزن تر برگ L.F.W
شوری Salinity (S)		150.01***	144.8***	1311.7***	120.00*	112.26**	1029.65***	0.00***	1.52***	18.08***
اندوفیت Endophyte (E)		0.00*	22.75***	150.75***	0.00ns	17.54***	395.28***	0.068***	25.42***	410.19***
S×E		0.00ns	2.24***	7.06***	0.00ns	0.52ns	12.64**	0.00***	0.97***	7.79***
خطا Error		0.00	0.04	0.26	0.00	0.31	1.84	0.00	0.031	0.31
ضریب تغییرات C.V (%)		8.88	34.76	10.04	14.72	32.39	17.20	8.49	12.85	6.84

ns، *، ** و ***، به‌ترتیب، غیرمعنی‌دار، معنی‌داری در سطح پنج، یک و یک دهم درصد.

ns, *, ** and ***: non-significant, and significant at $p\leq0.05$, $p\leq0.01$ and $p\leq0.001$, respectively.

جدول ۲- تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی بیومس دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 2- The effect of the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the biomass of Mexican lime seedlings in the salinity condition (LSD, $p \leq 0.05$)

شوری (µS.cm^{-1})		وزن خشک ساقه S.D.W (gr)	وزن تر ساقه S.F.W (gr)	وزن خشک ریشه R.D.W (gr)	وزن تر ریشه R.F.W (gr)	وزن خشک برگ L.D.W (gr)	وزن تر برگ L.F.W (gr)
0	شاهد Control	1.53^{cd}	3.11^{d}	1.26^{d}	5.03^{d}	0.45^{e}	4.99^{e}
	اندوفیت Endophyte	5.26^{a}	11.29^{a}	3.81^{a}	17.22^{a}	3.42^{a}	15.26^{a}
2000	شاهد Control	1.13^{d}	2.79^{e}	0.91^{e}	4.26^{e}	0.43^{e}	4.12^{e}
	اندوفیت Endophyte	2.5^{b}	5.81^{c}	2.56^{b}	10.97^{b}	2.54^{b}	14.33^{b}
4000	شاهد Control	0.91^{e}	2.44^{ef}	0.79^{f}	3.75^{f}	0.33^{ef}	3.69^{ef}
	اندوفیت Endophyte	1.9^{c}	6.74^{e}	1.79^{c}	9.26^{bc}	1.79^{c}	9.4^{d}
6000	شاهد Control	0.84^{e}	2.2^{ef}	0.41^{g}	2.32^{g}	0.17^{g}	3.43^{ef}
	اندوفیت Endophyte	2.54^{b}	6.75^{b}	2.14^{b}	10.38^{b}	1.65^{cd}	10.41^{c}

اثر شوری و اندوفیت بر صفات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس مقدار نسبی آب برگ نشان دادند، اندوفیت و سطوح مختلف شوری در سطح احتمال ۰/۱ درصد اثر معنی‌داری نشان دادند. در نمونه‌های شاهد و تیمار شده، با افزایش سطح شوری، از میزان نسبی آب برگ کاسته شد. این کاهش می‌تواند به‌علت کاهش پتانسیل آب در اثر افزایش یون‌های نمک، کاهش رشد ریشه‌های مویین در اثر کاهش تقسیمات سلولی و رسوب یون‌های سمی همچون سدیم در ریشه باشد. با توجه به نتایج، بین میزان نسبی آب برگ و افزایش سطح شوری همبستگی منفی وجود داشت. با افزایش تنش شوری، محتوی نسبی آب کاهش یافت. کاهش محتوی نسبی آب در بافت‌های گیاه باعث تغییرات متابولیکی و فیزیولوژیک در گیاه و محدود شدن رشد گیاه می‌شود. از جمله تغییرات متابولیکی که در گیاه تحت تنش رخ می‌دهد، اختلال در روند هدایت روزنه‌ای می‌باشد. کاهش هدایت روزنه‌ای باعث کاهش ورود دی اکسید کربن به درون بافت برگ‌ها شده و در نتیجه کاهش فتوسنتز را به همراه خواهد داشت (Atteya, 2003). در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی توانست باعث افزایش ۴۱/۸۶ درصدی محتوی نسبی آب دانهال‌ها نسبت به نمونه شاهد شود (جدول ۲).

یکی از اثرات زیان‌بار شوری بر فعالیت‌های متابولیکی گیاه، تخریب پروتئین‌ها می‌باشد. از دلایل دیگری که می‌توان به تجمع بیشتر مولکول‌های آب درون بافت برگ دانهال‌های تلقیح شده نسبت داد، تجمع مولکول‌های پرولین، پروتئین و یا قندهای بیشتر درون بافت آن‌ها باشد. با بالا رفتن میزان این مولکول‌ها در درون سلول گیاهی، فشار اسمزی آن‌ها منفی‌تر شده و در نتیجه آب بیشتری را به سمت بافت‌ها جذب می‌کنند؛ که این امر خود باعث بالا رفتن محتوی نسبی آب در گیاه می‌شود (Moustakas *et al.*, 2011; García- Sánchez *et al.*, 2007). نتایج تجزیه واریانس مقدار پروتئین کل برگ نشان داد، اثر اندوفیت و شوری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری بود. با افزایش سطوح شوری، میزان پروتئین کل موجود در دانهال‌های تلقیح شده و شاهد کاهش یافت، اما در آخرین سطح شوری، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌های تلقیح شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از (۲۲/۶۲ درصد) نمونه‌های شاهد بود (جدول ۴).

اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، ترکیباتی مثل مالون دی‌آلدئید تولید می‌کند که شاخصی از میزان صدمه اکسیداتیو به شمار می‌رود. تجزیه واریانس نتایج بررسی میزان پراکسیداسیون غشاء سلولی گیاهان نشان داد، با افزایش سطوح شوری، میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید افزایش پیدا کرده است. اما میزان افزایش این ترکیب در نمونه‌های تلقیح شده به‌طور معنی‌داری از نمونه‌های شاهد کمتر بود (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس مقدار مالون‌دی‌آلدئید نشان داد، اثر اندوفیت و شوری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری بود. اندوفیت‌ها توانسته بودند به‌طور معنی‌داری باعث استحکام دیواره سلولی نسبت به نمونه شاهد شوند. در تحقیقات گذشته نیز نشان داده شده است که اعمال اندوفیت‌های قارچی به گیاه گندم و برنج،

توانسته بود باعث کاهش تولید ترکیب مالون‌دی‌آلدئید در آن‌ها شود (Zhang & Nan, 2007Shukla *et al*., 2012 ;) که نشانگر تأثیر آن‌ها در افزایش پایداری غشاء می‌باشد. مقدار پراکسیده شدن لیپیدها، یک رابطه تعادلی بین تولید ROSها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سلول و یا بافت می‌باشد. نشان داده شده است که ROSها می‌توانند بر بیوسنتز هورمون ABA و سیگنال‌هایی که باعث ورود یون‌ها Ca^{+2} به درون سلول‌های محافظ روزنه می‌شوند تأثیر بگذارند و باز ماندن روزنه‌ها را کاهش دهند. با افزایش تولید ROSها و سنتز بیشتر هورمون ABA در شرایط تنش شوری آب، روزنه‌ها بیشتر بسته می‌شوند (Kaya *et al*., 2006). در آخرین سطح شوری، ترکیب اندوفیت توانسته بود به‌میزان ۳۵/۱۸ درصد تولید مالون‌دی‌آلدئید را در دانهال‌های تلقیح شده نسبت به شاهد کاهش دهد (جدول ۴). نتایج حاصل با یافته‌های صادقی و همکاران (Sadeghi *et al*., 2020) قرابت نزدیکی داشت.

نتایج تجزیه واریانس مقدار قندهای کل محلول نشان داد، اثر اندوفیت و شوری در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنـی‌داری بود. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی توانسته بود باعث افزایش ۱۷/۸۵ درصدی میزان قندهای محلول در نمونه‌های تلقیح شده نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

افزایش میزان قندهای محلول در سلول‌های گیاهی، باعث کاهش اثرات سوء شوری از جمله کاهش محتوی نسبی آب می‌شود. نمونه‌های تلقیح شده دارای محتوی نسبی آب بالاتری نسبت به نمونه‌های شاهد بودند. در تحقیقات پیشین که اثر تنش شوری و خشکی در انواع مرکبات مورد بررسی قرار گرفته شده بود، مشاهده شد که اعمال تنش باعث افزایش میزان قندهای محلول در مرکبات می‌شود که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Xie *et al*., 2012 García- Sánchez *et al*., 2007;).

اثر شوری و اندوفیت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس اثر شوری و اندوفیت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی نشان دادند، اثر اندوفیت و شوری در تمام آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنـی‌داری بود. آنزیم پراکسیداز یکی از سیستم‌های مهمی است که باعث حذف پراکسید هیدروژن در گیاهان می‌شوند. تأثیر افزایش آنزیم پراکسیداز تحت تنش و تأثیر بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدها به اثبات رسیده است (Strobel *et al*., 2004). افزایش این آنزیم در گیاهان، نقش حمایت کننده آنزیم از گیاه در شرایط تنش شوری را ایفا می‌کند. در سطوح مختلف شوری (صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر)، اعمال ترکیب اندوفیتی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۱۷۷/۸۲، ۱۷۳/۳۳، ۱۴۲/۱ و ۶۶/۸ درصدی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد شود (جدول ۴).

دانهال‌های تلقیح شده دارای مقادیر بالاتر فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز نسبت به شاهد بودند. به‌نظر می‌رسد، از دلایلی که می‌توان برای افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط تنش در نظر گرفت، تأثیر اندوفیت‌ها بر بیان ژن‌های سنتز کننده این آنزیم‌ها و افزایش فعالیت آن‌ها باشد (Hayat *et al*., 2007 Ali *et al*., 2007 ;). افزایش فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدانی، باعث افزایش پایداری غشا در دانهال‌های تلقیح شده و کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید در آن‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد شد. نتایج نشان دادند، در سطوح مختلف شوری اعمال شده، ترکیب اندوفیتی قارچی و باکتریایی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۵۷۲/۱۵ (۵/۷ برابر)، ۱۵۰/۰۹، ۱۶۶/۵۵ و ۶۰/۰۱ درصدی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نسبت به شاهد شود (جدول ۴). در تحقیقات پیشین نیز این افزایش فعالیت آنزیمی به اثبات رسیده است (Hayat *et al*., Ali *et al*., 2007 ;2007). این محققین گزارش کردند، باکتری‌های اندوفیت استخراج شده از درختان حرا، باعث افزایش فعالیت آنزیمی در گیاهچه‌های گوجه فرنگی تلقیح شده با این اندوفیت تحت شرایط شوری شدند.

اسکوربیک‌پراکسیداز نیز از جمله آنزیم‌های مهمی است که نقش اساسی در محافظت گیاه در برابر تنش‌ها را ایفا می‌کند. آنزیم‌هایی چون اسکوربیک‌پراکسیداز، جزو آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در تنش‌ها اکسیداتیو، از طریق مکانیسم سم‌زدایی از صدمه دیدن گیاه جلوگیری می‌کنند (Gill *et al*., 2013 Asada, 1994 ;). در این چرخه، آن‌ها از طریق احیای H_2O_2 باعث تبدیل این ترکیب به آب می‌شوند. افزایش این آنزیم در گیاهان، نقش حمایت کننده از گیاه در شرایط تنش شوری را ایفا می‌کند. دانهال‌های تلقیح شده با اندوفیت قارچی و باکتریایی، دارای مقادیر بالاتر فعالیت آنزیمی پراکسیداز بودند. در این تحقیق، در شوری‌های مختلف اعمال شده، ترکیب اندوفیتی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۱۱۸/۴۱، ۵۰/۲۶، ۲۵/۱۱ و ۲۴/۸۸ درصدی میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز نسبت به شاهد شود (جدول ۵). در تحقیقات پیشین نیز این افزایش فعالیت آنزیمی به اثبات رسیده است (Hayat *et al*., Ali *et al*., 2007 ;2007).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 اندوفیت بر رنگدانه‌های فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی دانهال‌های مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 3- ANOVA for the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the photosynthesis pigments and biochemical characteristics of Mexican lime seedlings in the salinity condition

منابع تغییر S.O.V	قندهای محلول Sluble sugars	مالون دی آلدئید MDA	پروتئین Protein	محتوی نسبی آب RWC	کاروتنویید Carotenoids	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a
شوری Salinity (S)	1204.5***	23.57***	2640.02***	290.45***	24.01***	0.71***	0.081***	0.131***
اندوفیت Endophyte (E)	1176***	47.82***	74.65***	3608.85***	0.13***	0.16***	0.029***	0.36***
S×E	523***	1.22*	3.5*	516.14***	0.00*	0.00*	0.01***	0.02***
خطا Error	1	0.37	1.37	7.52	0.00	0.00	0.00	0.00
ضریب تغییرات C.V (%)	0.8	10.64	3.72	7.25	2.95	3.17	1.7	1.28

* و ***، به‌ترتیب، معنی‌داری در سطح پنج و یک دهم درصد.

* and ***: Significant at $p\leq0.05$ and $p\leq0.01$ respectively.

جدول ٤- تأثیر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی رنگدانه‌های فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 4- The effect of the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculation on Photosynthesis pigments and biochemical characteristics of Mexican lime Seedlings in salinity condition (LSD, $p\leq0.05$)

شوری Salinity ($\mu S.cm^{-1}$)		قندهای محلول Sluble sugars (mg/g fw)	مالون دی آلدئید MDA (nmol/g dry w)	پروتئین Protein (%)	محتوی نسبی آب WC (%)	کاروتنویید Carotenoids (mg/g fw)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g fw)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g fw)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g fw)
0	شاهد Control	93^{f}	4.91^{e}	31.14^{c}	77.14^{b}	0.32^{bc}	1.6^{b}	0.69^{a}	0.91^{ab}
	اندوفیت Endophyte	123^{c}	1.43^{g}	35.05^{a}	93.7^{a}	0.46^{a}	1.71^{a}	0.7^{a}	0.99^{a}
2000	شاهد Control	115^{d}	6.96^{b}	30.24^{cd}	75.84^{de}	0.28^{c}	1.52^{c}	0.65^{b}	0.72^{c}
	اندوفیت Endophyte	134^{bc}	4.01^{f}	32.35^{b}	88.38^{b}	0.44^{a}	1.64^{b}	0.68^{a}	0.96^{b}
4000	شاهد Control	149^{a}	7.32^{b}	28.48^{ef}	62.45^{f}	0.24^{d}	1.07^{e}	0.44^{d}	0.53^{d}
	اندوفیت Endophyte	136^{b}	5.81^{d}	31.06^{c}	87.75^{b}	0.4^{ab}	1.27^{d}	0.63^{bc}	$0.9b^{c}$
6000	شاهد Control	112^{e}	9.52^{a}	24.26^{g}	57.57^{g}	0.22^{de}	0.81^{f}	0.42^{de}	0.46^{e}
	اندوفیت Endophyte	132^{bc}	6.17^{cd}	29.75^{e}	81.67^{c}	0.35^{b}	1.04^{e}	0.47^{c}	0.76^{c}

به‌نظر می‌رسد در مرکبات، تنظیم کننده‌های مخصوصی برای فعالیت آنزیم‌ها تحت شرایط تنش شوری وجود دارد. این پاسخ‌ها شامل روابط پیچیده‌ای هستند که نیاز به مطالعه و بررسی‌های بیشتری دارد. گوتتا داها و همکاران (Gueta-Dahan *et al.*, 1997) نشان دادند، تنش اکسیداتیو در مرکبات، با فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چون سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز و کاهش اسکوربیک پراکسیداز همراه بوده است. در بررسی انجام شده، در سطوح مختلف شوری، اعمال ترکیب اندوفیت توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۸۰/۹۱، ۳۲/۱، ۱۳۲/۰۴ و ۲۳۲/۴۱ درصدی میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نسبت به شاهد شود (جدول ۶).

در مقابله گیاه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و شرایط نامساعد محیطی، هر چه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بالاتر باشد، توانایی گیاه برای مقابله با شرایط نامساعد بالاتر خواهد بود. عدم تجمع رادیکال-های آزادی چون O^- یا H_2O_2 در گیاهان تحت شرایط تنش، به‌دلیل وجود آنزیم‌های آنتی اکسیدانی چون کاتالاز می‌باشد (Naveed *et al.*, 2014). کاتالازها پروتئین‌های آنزیمی هستند که سلول‌های زنده را در برابر صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کنند و باعث تغییر O^- و H_2O_2 به شکل O_2 و H_2O می‌شوند (Halo *et al.*, 2015). در

تحقیق حاضر، در سطوح مختلف شوری، اعمال ترکیب اندوفیتی توانست به‌ترتیب باعث افزایش ۲۷۳/۹۳، ۵۵/۴۱، ۵۱/۲ و ۱۴۱/۸۴ درصدی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد شود (جدول ۵).

از آنجا که در زمان تنش، کاتالاز به هموستازی اکسیژن فعال کمک می‌کند، میزان فعالیت این آنزیم در زمان تنش افزایش می‌یابد (Magbanua *et al.*, 2007). محققان بر این باورند که افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به نوع بافت گیاه، رقم گیاه، شرایط آزمایش، شدت تنش و موارد دیگر بستگی دارد. اما اکثر محققین نظر بر افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش نسبت به شرایط غیر تنش دارند.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 اندوفیت بر ظرفیت آنتی اکسیدانی بیوشیمیایی دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 5- ANOVA for the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculations on the antioxidant capacity of Mexican lime Seedlings in salinity condition

منابع تغییر S.O.V	اسکوربیک پراکسیداز Ascorbate peroxidase	گلوتاتیون ردوکتاز Glutathione reductase	سوپراکسیداز Superoxide dismutase	پراکسیداز peroxidase	کاتالاز Catalase
شوری Salinity (S)	129913.47***	311048.1***	71832.22***	399.99***	648.1***
اندوفیت Endophyte (E)	357530.09***	2975.8***	181219.52***	3071.34***	4026.15***
S×E	15245.16***	535.85***	20943.12***	81.62***	22.28***
خطا Error	13.37	0.89	0.011	0.94	1.16
ضریب تغییرات C.V (%)	0.54	3.39	0.047	3.62	10.64

***، معنی‌داری در سطح یک دهم درصد

***, Significant at $p \leq 0.01$

جدول ٦- تأثیر تلقیح اندوفیت قارچی و باکتریایی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 روی ظرفیت آنتی اکسیدانی دانهال‌های لیموترش رقم مکزیکن لایم تحت تنش شوری

Table 6- The effect of the *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 endophytic fungi and bacteria inoculation on antioxidant capacity of Mexican lime Seedlings in salinity condition (LSD, $p \leq 0.05$)

شوری Salinity ($\mu S.cm^{-1}$)		اسکوربیک پراکسیداز Ascorbate peroxidase (units/mg dry wt)	گلوتاتیون ردوکتاز Glutathione reductase (units/mg dry wt)	سوپراکسیداز Superoxide dismutase (units/mg dry wt)	پراکسیداز peroxidase (units/mg dry wt)	کاتالاز Catalase (units/mg dry wt)
0	شاهد Control	324.28^{f}	10.48^{g}	22.66^{h}	9.83^{g}	15.27^{g}
	اندوفیت Endophyte	708.57^{c}	18.96^{e}	153.31^{e}	27.31^{d}	57.3^{c}
2000	شاهد Control	492.85^{e}	16.29^{f}	145.69^{f}	15.19^{f}	44.3^{e}
	اندوفیت Endophyte	739.28^{bc}	21.52^{c}	364.37^{b}	41.52^{b}	68.85^{a}
4000	شاهد Control	614.28^{d}	19.38^{d}	198.67^{d}	21.92^{e}	41.5^{f}
	اندوفیت Endophyte	768.57^{d}	44.97^{b}	529.57^{a}	73.07^{a}	62.75^{b}
6000	شاهد Control	769.28^{b}	20.44^{c}	132.45^{g}	30.64^{c}	19.5^{h}
	اندوفیت Endophyte	960.71^{a}	68.15^{a}	211.94^{c}	51.11^{f}	67.16^{d}

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان دادند، لیموترش رقم مکزیکن لایم، گیاهی حساس به تنش شوری می‌باشد؛ اما تلقیح دانهال‌ها با اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی توانست نتایج خوبی را حاصل نماید. ترکیب اندوفیتی باعث ارتقاء صفات رشدی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان قندهای کل محلول، محتوی نسبی آب برگ، رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین نسبت به نمونه شاهد در شرایط تنش شوری شد. طبق منابع موجود، اندوفیت قارچی *A. niger* و باکتری‌های جنس *Bacillus* از مهم‌ترین و اصلی‌ترین جنس‌های استخراج شده از اکوسیستم‌های دریایی و ماکروجلبک‌ها می‌باشند. اکثر متابولیت‌های حاصل از اندوفیت‌های قارچی حاصل از دریا نیز، از جنس *A. niger* بوده است. این قارچ تحمل بالایی نسبت به غلظت-های مختلف کلرید سدیم موجود در محیط‌کشت دارا می‌باشد. نتایج آزمون تحمل تنش شوری جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه، نشان دادند که جدایه‌ها قادر به تحمل شوری سه مولار نمک در محیط‌کشت خود بودند که در نوع خود بی‌نظیر است. این درحالی‌است که شوری آب دریا کمتر از یک مولار می‌باشد. اندوفیت‌ها با موفقیت توانستند، در بافت دانهال‌های مکزیکن لایم تلقیح شده، استقرار یابند و باعث بهبود صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشمیایی، آنتی‌اکسیدانی، بهبود رنگدانه‌های فتوسنتزی چه در شرایط اعمال تنش و چه در شرایط غیر تنش شوند. همچنین، بررسی‌ها نشان دادند، سه مرحله تلقیح در طول سه هفته (هفته‌ای یک‌بار) زمانی مناسب برای تلقیح و استقرار اندوفیت‌ها بوده است. نتایج حاصل، این فرضیه را اثبات می-کنند که استفاده از اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی، گامی مؤثر در افزایش رشد و تحمل به تنش شوری در دانهال‌های مکزیکن لایم تلقیح شده بود. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی، این قابلیت را دارند که به‌عنوان گزینه‌ای مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی از جمله شوری مطرح شوند. این موضوع می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب در جهت ایجاد کشاورزی پایدار و دوست‌دار محیطزیست، در کاهش اثرات منفی کودهای شیمیایی مطرح شود.

با وجود اینکه در برخی کشورها از جمله، چین، کره، آمریکا و هند در زمینه استخراج و شناسایی اندوفیت‌های جلبک‌ها و دیگر موجودات زیستگاه‌های آبی و ترکیبات فعال طبیعی آن‌ها به‌طور جدی کار شده است، در ایران کمتر به این مسئله پرداخته شده است. اگر چه این تحقیق اولین گزارش از اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی همزیست با جلبک‌های موجود در خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد، اما تحقیقات بیشتری در زمینه شناسایی، عملکرد و جنبه‌های اکولوژیکی این نوع اندوفیت‌ها را می‌طلبد. برخی از این گونه‌های شناسایی شده پتانسیل افزایش تحمل گیاهان نسبت به شرایط تنش شوری را دارا می‌باشند. همچنین، بهتر است که ارتباط پیچیده موجود بین جلبک‌ها و باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت همزیست با آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. علاوه‌بر این، مخزن میکروبی موجود در جلبک‌های دریایی می-تواند گام مهمی در کشف ترکیبات فعال زیستی جهت تولید تجاری داروهای باارزش باشد.

سپاسگزاری

در اینجا جا دارد از دانشگاه هرمزگان و آزمایشگاه محیطزیست استان هرمزگان تقدیر و تشکر نماییم. همچنین از خانم مهندس رام، آقای دکتر ربیعی و آقای مهندس خسروی که در نمونه‌برداری و پیشبرد پروژه همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر را داریم.

References

1- Ali, A., Shahzad, R., Khan, A.L., Halo, B.A., Al-Yahyai, R., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Lee, I.J. (2017). Endophytic bacterial diversity of *Avicennia marina* helps to confer resistance against salinity stress in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Interactions*, *12*(1), 312–322. https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1362051

2- Ali, B., Hayat, S., & Ahmad, A. (2007). 28-Homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, *59*(2), 217–223. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.002

3- Al-Yassin, A. (2005). Adverse effects of salinity on *citrus*. *International Journal of Agriculture & Biology*, *7*(4), 668-680.

4- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*(1), 1-15.

5- Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, 77–104.

6- Atteya, A.M. (2003). Alteration of water relations and yield of corn genotypes in response to drought stress. Bulgarian. *Journal of Plant Physiology*, *29*(1-2), 63–76.

7- Auge, R.M., Stodola, A.J., Tims, J.E., & Saxton, A.M. (2001). Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*, *230*(1), 87–97. https://doi.org/10.1023/A:1004891210871

8- Becana, M., Aparicio-Tejo, P., Irigoyen, J.J., & Sanchez-Diaz, M. (1986). Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiology*, *82*(4), 1169–1171.
9- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(1), 11–18.
10- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248–254.
11- Chance, B., & Maehly, AC. (1955). Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 764–775.
12- Del Rio, L. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botani*, *66*, 2827–2837.
13- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P.A.M.E.L.A., & Thorpe, T.A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, *32*(1), 93–101. https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93
14- Dodd, I.C., & Pérez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, *63*(9), 3415–3428. https://doi.org/10.1093/jxb/ers033
15- Ennab, H.A. (2016). Effect of humic acid on growth and productivity of Egyptian lime trees (*Citrus aurantifolia* swingle) under salt stress conditions. *Journal of Agriculture Research Kafr El-Sheikh Universisty*, *42*(4), 494–505.
16- Flewelling, A.J., Currie, J., Gray, C.A., & Johnson, J.A. (2015). Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. *Current Science*, 88–111.
17- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO.org. (n.d.). Retrieved June 12. 2015.
18- García- Sánchez, F., Syvertsen, J.P., Gimeno, V., Botía, P., & Perez- Perez, J.G. (2007). Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water- use efficiency. *Physiologia Plantarum*, *130*(4), 532–542. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00925.x
19- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., & Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 204–212. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032
20- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A., & Ben-Hayyim, G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*, *203*(4), 460–469. https://doi.org/10.1007/s004250050215
21- Halo, B.A., Khan, A.L., Waqas, M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Ali, L., Adnan, M., & Lee, I.J. (2015). Endophytic bacteria (*Sphingomonas* sp. LK11) and gibberellin can improve *Solanum lycopersicum* growth and oxidative stress under salinity. *Journal of Plant Interactions*, *10*(1), 117–125. https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1033659
22- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A., & Ahmad, A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, *60*(1), 33–41. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.002
23- Heidarvand, L., & Amiri, R.M. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress?. *Acta Physiologiae Plantarum*, *32*(3), 419–431. https://doi.org/10.22059/ijfcs.2019.281022.654611
24- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., & Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, *207*(4), 604–611. https://doi.org/10.1007/s004250050524
25- Jogawat, A., Saha, S., Bakshi, M., Dayaman, V., Kumar, M., Dua, M., Varma, A., Oelmüller, R., Tuteja, N., & Johri, A.K. (2013). *Piriformospora indica* rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, *8*(10), 26891. https://doi.org/10.4161/psb.26891
26- Joshi, R., Mangu, V.R., Bedre, R., Sanchez, L., Pilcher, W., Zandkarimi, H., & Baisakh, N. (2015). Salt adaptation mechanisms of halophytes: improvement of salt tolerance in crop plants, In Elucidation of abiotic stress signaling in plants. *Springer, New York, NY*, 243–279.
27- Kaya, M.D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., & Kolsarıcı, Ö. (2006). Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, *24*(4), 291–295. https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001
28- Khan, A.L., Waqas, M., Asaf, S., Kamran, M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M.A., Kang, S.M., Kim, Y.H., Yun, B.W., & Al-Rawahi, A. (2017). Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. *Environmental and Experimental Botany*, *133*, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.09.009
29- Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Jung, H.Y., Lee, J.H., & Lee, I.J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*, *12*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-3

30- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Handbook of phycological methods. *Phycological and Biochemical Methods*, 95. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001
31- Krishna, G., Singh, B.K., Kim, E.K., Morya, V.K., & Ramteke, P.W. (2015). Progress in genetic engineering of peanut (*Arachis hypogaea* L.) A review. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(2), 147–162. https://doi.org/10.1111/pbi.12339
32- Li, Y. (2008). Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Limonium bicolor*. *Plant Soil Environent*, *54*(11), 493–497. https://doi.org/10.17221/434-PSE
33- MacArtain, P., Gill, C.I., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I.R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*, *65*(12), 535–543. https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.535-543
34- Magbanua, Z.V., De Moraes, C.M., Brooks, T.D., Williams, W.P., & Luthe, D.S. (2007). Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*?. *Molecular Plant-microbe Interactions*, *20*(6), 697–706. https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0697
35- Meggio, F., Prinsi, B., Negri, A.S., Simone, Di Lorenzo, G., Lucchini, G., Pitacco, A., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., & Espen, L. (2014). Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *20*(2), 310–323. https://doi.org/10.1111/ajgw.12071
36- Mišurcová, L., Buňka, F., Ambrožová, J.V., Machů, L., Samek, D., & Kráčmar, S. (2014). Amino acid composition of algal products and its contribution to RDI. *Food Chemistry*, *151*, 120–125. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.040
37- Morgan, J.A. (1984). Interaction of water supply and N in wheat. *Plant Physiology*,*76*(1), 112–117.
38-Moustakas, N.K., Akoumianakis, K.A., & Passam, H.C. (2011). Patterns of dry biomass accumulation and nutrient uptake by okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.) under different rates of nitrogen application. *Australian Journal of Crop Science*, *5*(8), 993–1000.
39- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual. Rev, Plant Biology*, *59*, 651–681. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
40- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, *22*(5), 867–880. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
41- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T.G., Wieczorek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, *97*, 30–39.
42- Pal, S., Singh, H.B., Farooqui, A., & Rakshit, A. (2015). Fungal biofertilizers in Indian agriculture: perception, demand and promotion. *Journal of Eco-friendly Agriculture*, *10*(2), 101–113.
43- Peng, Z., Xin, L., & Bin-Gui, W. (2016). Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi. *Chemical Diversity and Biological Activity*, *82*(09/10), 832–842. https://doi.org/10.1055/s-0042-103496
44- Sadeghi, F., Samsampour, D., Seyahooei, M.A., Bagheri, A., & Soltani, J. (2020). Fungal endophytes alleviate drought-induced oxidative stress in mandarin (*Citrus reticulata* L.): Toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Scientia Horticulturae*, *261*, 108991. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108991
45- Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2007). ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(5), 1283–1292. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x
46- Shukla, N., Awasthi, R.P., Rawat, L., & Kumar, J. (2012). Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *54*, 78–88. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.001
47- Smith, I.K., Vierheller, T.L., & Thorne, C.A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, *175*(2), 408–413. https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7
48- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 491–502. https://doi.org/10.1128%2FMMBR.67.4.491-502.2003
49- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, *67*(2), 257–268. https://doi.org/10.1021/np030397v
50- Suryanarayanan, T.S., Venkatachalam, A., Thirunavukkarasu, N., Ravishankar, J.P., Doble, M., & Geetha, V. (2010). Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. *Botanica Marina*, *53*(5), 457-468. https://doi.org/10.1515/bot.2010.045
51- Verma, A., Malik, C.P., & Gupta, V.K. (2012). In vitro effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut. *International Scholarly Research Notices*, *1*, 1-8. https://doi.org/10.5402/2012/356485

52- Volkmann, H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L., & Sant'Anna, E.S. (2008). Cultivation of Arthrospira (*Spirulina platensis*) in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*(1), 98–101. https://doi.org/10.1590%2FS1517-838220080001000022

53- Xie, S.X., Lu, X.P., Ni, Q., & Zhao, X.L. (2012). *The effect of water stress on ABA, Jaand physiological characteristic of Citrus*. In XII International Citrus Congress, 125.

54- Yaish, M.W., Antony, I., & Glick, B.R. (2015). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *107*(6), 1519–1532. https://doi.org/10.1007/s10482-015-0445-zPMID:25860542

55- Yaish, M.W., & Kumar, P.P. (2015). Salt tolerance research in date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.), past, present, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 348. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00348

56- Zhang, Y.P., & Nan, Z.B. (2007). Growth and anti- oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *193*(6), 377–386. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00279.x

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 509-521

The Effect of Plant Growth Promoting Bacteria in Hydroponics Cultivation Conditions on Iron Concentration, Yield and Phenolic Compounds of Lettuce

P. Molaei[1]*, F. Nekounam[2], M. BabaAkbari Sari[3]

1 and 2- M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: pmolaei@znu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: 14-05-2023
Revised: 06-09-2023
Accepted: 24-01-2024
Available Online: 27-01-2024

How to cite this article:
Molaei, P., Nekounam, F., & BabaAkbari Sari, M. (2024). The effect of plant growth promoting bacteria in hydroponics cultivation conditions on iron concentration, yield and phenolic compounds of lettuce. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 509-521. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.82408.1266

Introduction

Over time, water deficit and environmental pollution by traditional agriculture that forces the producer to contribute to competitive and sustainable agriculture. Leafy vegetables are beneficial to human health, therefore, to adapt an eco-friendly approach in some vegetables, the partial substitution (25–50%) of mineral NPK by biofertilizers in lettuce improves the yield and agronomic features and produces healthy plants for human nutrition as well. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) from Asteraceae family is considered as one of the most popular salad vegetables as a cool season crop. PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) are rhizosphere bacteria that improve plant growth through a broad range of processes, i.e., phosphate solubilization, biological nitrogen fixation, siderophore manufacturing, phytohormone manufacturing, antifungal activity, systemic resistance induction and plant-microbe symbiosis promotion. The promoting of growth and yield of horticultural crops such as cucumber, potato, tomato and spinach by plant growth promoting bacteria inoculation at nutrient solutions under soilless systems have also been reported.

Material and Methods

In order to study the effect of growth-promoting bacteria on the yield, iron concentration and phenolic compounds of lettuce (*Lactuca sativa* cv. New Red Fire) under floating systems, the experiment was carried out in a completely randomized design with three replications in the Research greenhouse of University of Zanjan, during 2020. Experiment treatments consisted of five levels of PGPB (*Pseudomonas vancouverensis*, *Pseudomonas koreensis*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* putida, and one level of combined bacteria (*Pantoea agglomerans+ Pseudomonas koreensis + Pseudomonas putida+ Pseudomonas vancouverensis*)) and control plant (without bacteria treated). Application of bacteria was done in two stages, one step before cultivation as seed inoculation and the next step as root inoculation. Lettuce plants grown in hydroculture condition with Hoagland nutrient solution. Growth conditions were environmentally controlled at a relative humidity of 60/70 % day/night and temperature was maintained between 20 and 17 °C. At 40 days after transplanting date, the lettuce head were harvested. The freshly harvested lettuce head were immediately weighed separately of each plant for fresh weight determination. Leaf samples were dried at 72 °C for 48 h in a drying oven and kept for further investigations. Also, leaf number per plant, chlorophyll and carotenoids contents, Fe concentration, total phenol, total flavonoids and anthocyanin contents were measured.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.82408.1266

Results

The obtained results in the current study indicated that the application of PGPB on lettuce caused significant increase in growth, photosynthetic pigments and iron concentration. The maximum growth rate and photosynthetic pigments content was observed in combined four bacteria treatment, so that, an increase of 388.2% chlorophyll a, 439.8% chlorophyll b, 398.3% total chlorophyll, 246.3% carotenoids contents, 42.6% plant fresh weight and 22.2% number of leaves was obtained compared to control plants. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) can enhance growth and development of plants. PGPB have direct and indirect influences on plant growth process. The immediate promotion of growth involves either supplying the plant with a compound produced by the bacteria, i.e., phytohormones, or promoting certain nutrient uptake from the setting. Whereas, the indirect plant growth promotion happens when PGPB decreases or prevents the deleterious impacts of one or more phytopathogenic species. Plants inoculated with PGPB showed higher leaf iron concentration compared to control plant. Thus inoculation with combined four bacteria induced a 26.2 % increase of lettuce leaves iron concentration. The obtained results in the current study revealed that the inoculation with PGPB significant decreased the total phenol, flavonoid and anthocyanin contents. The maximum content of phenol (483 µg g^{-1}FW), flavonoid (188.1 µg g^{-1}FW) and anthocyanin (27.5 µmol g^{-1}FW) were observed in control plants compared to treated plants.

Conclusion

According to the results of this research, the use of PGPB in the hydroculture system, on the one hand, led to a significant increase in iron absorption, the synthesis of photosynthetic pigments, and subsequently promote growth and increases lettuce yield. On the other hand, due to facilitating the growth conditions and increasing the absorption of nutrients for the host plants as a result of inoculation with PGPB, led to a decreases of phenolic compounds including total phenol, total flavonoid and anthocyanin contents.

Keywords: Anthocyanin, Hydroponics, Iron, PGPR, Phenolic compounds

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۰۹-۵۲۱

اثر باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر غلظت آهن، عملکرد و ترکیبات فنولیک کاهو

پرستو مولائی[۱*]- فاطمه نکونام[۲]- محمد بابااکبری ساری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۴

چکیده

یکی از مهمترین سبزی‌های برگ‌دار، کاهو (*Lactuca sativa* L.) است که مقصد تولید آن بـه بازارهـای بین‌المللـی و ملـی می‌باشـد. کـاهو از سبزی‌هایی است که در سیستم‌های کشت هیدروپونیک شناور، برای بهره‌وری بالاتر در استفاده از آب و کودها تولید می‌گردد. کاربرد باکتری‌های محرک رشد برای افزایش عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی در نظام‌های پایدار کشاورزی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. بدین جهت، به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت، بر ویژگی‌های کیفی و عملکرد کـاهو رقـم 'New Red Fire'، آزمایشـی به‌صـورت طـرح کـاملا تصادفی در سـه تکـرار انجـام شـد. تیمارهـای آزمایشـی شـامل پـنج سـطح از باکتری‌هـای محـرک رشـد (*Pseudomonas vancouverensis*، *Pseudomonas Koreensis*، *Pseudomonas putida*، *Pantoea agglomerans*، ترکیب چهار گونه باکتری) و تیمـار شـاهد بـدون تلقـیح باکتریایی بود. صفات مورد بررسی شامل وزن تر بوته، تعداد برگ، محتوای فنول کل و فلاونوئید کل، محتوای آنتوسیانین، غلظـت آهـن، کلروفیل‌هـا و کاروتنوئید کل بود. نتایج نشان داد، اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر صفات مورد بررسی معنی‌دار گردید. بیشـترین عملکـرد بیولوژیـک، محتـوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و غلظت آهن در برگ، با کاربرد تیمار باکتری ترکیبی مشاهده شد، به‌طوری‌که افزایش ۳۸۸/۲ درصد کلروفیل a، ۴۳۹/۸ درصـد کلروفیل b، ۳۹۸/۳ درصد کلروفیل کل، ۲۴۶/۳ درصد محتوای کاروتنوئید، ۲۶/۲ درصد غلظت آهن، ۴۲/۶ درصد وزن تر بوته و ۲۲/۲ درصد تعداد برگ نسبت به گیاهان شاهد حاصل شد. با این حال، کاربرد باکتری‌های محرک رشد در گیاه کاهو با تسهیل شرایط رشـد و افـزایش جـذب عناصـر غـذایی، موجب کاهش معنی‌دار سنتز ترکیبات فنولیک از جمله محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین در مقایسه با گیاهـان شـاهد، در شـرایط آبکشـت گردید. با توجه به اینکه بهترین تیمار این پژوهش در اغلب صفات مورد بررسی، کاربرد باکتری ترکیبی بود، برای دستیابی به حداکثر عملکـرد، افـزایش سودمندی کل و کاهش مصرف نهاده‌های شیمیایی، استفاده از باکتری ترکیبی توصیه می‌شود. البته اگر بتوان با اعمال راهکارهایی به‌صـورت همزمـان کیفیت تغذیه‌ای کاهو به‌ویژه محتوای ترکیبات فنولیکی و فلاونوئیدی گیاه را نیز در شرایط آبکشت افزایش داد، بسیار مطلوب‌تر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آهن، باکتری‌های محرک رشد گیاهی، ترکیبات فنولی، هیدروپونیک

مقدمه

امروزه در سراسر جهان، کشت بدون خاک سبزی‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف رایج شده است. سیستم‌های هیدروپونیک نسبت به کشت خاکی دارای فوایدی از جمله، استفاده مجدد از آب و عناصر غذایی، کنترل مطلوب شرایط محیطی و پیشگیری از بیماری‌ها و آفات خاک‌زی می‌باشند (Lommen, 2007). کاربرد بیش از حد کودهای شیمیایی در کشاورزی، موجب افزایش خطرات زیست‌محیطی و آسیب به سلامت انسان، حیوانات، اکوسیستم، کاهش بهره‌وری کشاورزی و اختلال در تعادل اکوسیستم طبیعی گردیده است. امروزه جهت اجتناب از چنین بحران‌های زیست‌محیطی، تولید کودهای زیستی سازگار با محیطزیست با کارایی اقتصادی و سود بالاتر در مقایسه با کودهای شیمیایی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. برای بهبود بهره‌وری کشاورزی و پایداری عملکرد، استفاده از باکتری‌های محرک رشد به‌عنوان کودهای زیستی، در مدیریت

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: pmolaei@znu.ac.ir)
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.82408.1266

کشاورزی مدرن بسیار مهم می‌باشد (Zandi & Basu, 2016). کاربرد میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های محرک رشد گیاهان (PGPR[1])، از طریق تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال عناصر غذایی، کنترل تنش‌های زیستی و غیرزیستی، سیستم انتقال آهن، رقابت با عوامل بیماری‌زا و تولید انواع هورمون‌های گیاهی، موجب ارتقای رشد و افزایش کیفیت در گیاهان میزبان می‌گردند (Lugtenberg & Kamilova, 2009). استگل‌مایر و همکاران (Stegelmeier *et al.*, 2022) گزارش کردند که باکتری‌های محرک رشد (PGPB) با کاهش تنش از طریق ACC دآمیناز، افزایش در دسترس بودن مواد مغذی از طریق حلالیت فسفر، سیدروفورها و تثبیت نیتروژن و همچنین کنترل زیستی بیماری‌های قارچی گیاهان در تولید هیدروپونیک، منجر به افزایش بیشتر عملکرد، پایداری محیطی و امنیت غذایی می‌شوند. علاوه بر این، راهی (Rahi, 2016) گزارش داد، باکتری‌های محرک رشد اثر مثبتی بر فعالیت فتوسنتزی، عملکرد گیاه، افزایش طول و رشد ریشه دارند. در میان باکتری‌های گرم منفی خاک، باکتری‌های *Pseudomonas* فراوان‌ترین جنس در ریزوسفر هستند. سویه‌های این جنس می‌توانند رشد گیاه را با تولید آنزیم‌ها، فیتوهورمون‌ها، سیدروفورها[2] و آنتی‌بیوتیک‌ها تقویت کنند (Esitken *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2015). گوپتا و همکاران (Gupta *et al.*, 2014) گزارش کردند، گونه‌های مختلف این جنس، توانایی تولید سیدروفور، فنازین، کیتیناز و پراکسیدازها را دارند. سیدروفورها از عوامل کلات‌کننده آهن و عامل انتقال آهن (III) به گیاه میزبان می‌باشند. انواع مختلفی از سیدروفورها در جنس‌های مختلف باکتری‌های محرک رشد شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفتند و ارتباط بین سنتز سیدروفورها با جذب آهن و تحریک رشد در باکتری‌های محرک رشد و گونه‌های مختلف گیاهان گزارش شده است (Sharma *et al.*, 2013; Cézard *et al.*, 2015; Cunrath *et al.*, 2015). آهن یکی از عناصر ریزمغذی و ضروری برای رشد گیاه می‌باشد که در سنتز کلروپلاست و فرآیندهای مختلف مانند فتوسنتز، تنفس و بیوسنتز کلروفیل نقش بسیار مهمی دارد، همچنین عنصر آهن جزء اصلی در سیستم احیاء سلولی محسوب می‌شود (Nagajyoti *et al.*, 2010; Kobayashi & Nishizawa, 2012). افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ از جمله کلروفیل توسط باکتری‌های محرک رشد علاوه بر توانایی افزایش جذب آهن، می‌تواند بر افزایش تثبیت نیتروژن و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و به تبع آن افزایش مقدار نیتروژن برگ‌ها نیز مؤثر باشد. علاوه بر این، افزایش غلظت کلروفیل با افزایش جذب نیتروژن رابطه مستقیمی دارد، چراکه نیتروژن نقش مهمی را در ساختمان کلروفیل ایفا می‌نماید (Mahfouz & Sharaf-Eldin, 2007). ریزوباکتری‌های محرک رشد در محیط‌کشت می‌توانند به‌صورت قارچ‌کش‌های بیولوژیکی و عوامل کنترل زیستی عمل نمایند (Singh *et al.*, 2011). دینگ و همکاران (Ding *et al.*, 2014) گزارش کردند، ترکیب جامعه باکتریایی در سیستم‌های کشت هیدروپونیک تحت تأثیر فعل و انفعالات گیاه میزبان قرار دارد. نقش این میکروارگانیسم‌ها در مدیریت کشاورزی پایدار بسیار مهم است.

کاهو با نام علمی *Lactuca sativa* L. مهم‌ترین سبزی سالادی، حاوی مقادیر فراوانی از فیبر، منگنز، فسفر، آهن، پتاسیم، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ویتامین‌های C، E و ترکیبات فنولی می‌باشد (Kim *et al.*, 2016). منزوکو و همکاران (Manzocco *et al.*, 2011) گزارش کردند، گیاهان کاهو در شرایط کشت هیدروپونیک نسبت به کشت خاکی دارای عملکرد و کیفیت بالاتری هستند. محققین بسیاری بهبود کیفیت و کمیت گیاهان، تحت تأثیر کاربرد باکتری‌های محرک رشد در هر دو سیستم کشت خاکی و هیدروپونیک را تأیید کرده‌اند (Lee *et al.*, 2010). افزایش وزن تر ریشه، اندام هوایی و عملکرد با کاربرد سویه‌های باکتری سودوموناس همراه با محلول‌های غذایی در شرایط کشت بدون خاک در گیاهان خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و اسفناج (Yasufumi & Kaneaki, 2003) گزارش شد. با توجه به کمبود تحقیقات در این زمینه و تمرکز مطالعات گذشته بر تأثیر کودهای زیستی در شرایط کشت خاکی، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر عملکرد، سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات فنولیکی و غلظت آهن در گیاه کاهو رقم 'New Red Fire' در شرایط آبکشت انجام شد.

مواد و روش

مواد گیاهی و شرایط کشت

این آزمایش در پاییز سال ۱۳۹۹ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در قالب طرح کاملاً تصادفی بر روی گیاه کاهو رقم 'New Red Fire' در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح از باکتری‌های محرک رشد (*Pseudomonas vancouverensis*، *Pseudomonas Koreensis*، *Pseudomonas putida*، *Pantoea agglomerans*، ترکیب چهار گونه باکتری) و تیمار شاهد شامل گیاهان بدون تلقیح باکتریایی بودند. تیمارهای آزمایشی در ۶ مخزن جداگانه اعمال شدند. سوسپانسیون جدایه‌های خالص باکتری‌های مورد آزمایش با جمعیت

1- Plant growth promoting rhizobacteria
2- Siderophore

$۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۸}$ ($CFU^{1}.g^{-1}$) از شرکت زیست‌فناور سبز در شهر تهران تهیه گردید. تلقیح باکتری‌ها در دو مرحله، یک مرحله قبل از کشت به‌صورت بذرمال و مرحله بعدی به‌صورت تلقیح ریشه انجام شد. برای این منظور ابتدا بذور با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به‌مدت یک دقیقه استریل سطحی شد، سپس به‌منظور حذف هیپوکلریت سدیم، بذرها با آب مقطر استریل ۱۰ بار شستشو شدند. پس از آن، بذرهای استریل شده به ارلن‌مایرهای حاوی سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی اضافه شدند و به‌مدت ۴۵ دقیقه بر روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از طی زمان مذکور، بذور در شرایط استریل فراهم شده با استفاده از دستگاه هود لامینار، از داخل ارلن‌مایرها خارج و به‌منظور حذف رطوبت اضافی روی آلومینیوم فویل استریل پخش شدند. در مرحله بعد، هنگام انتقال گیاهچه‌ها به مخزن محلول غذایی، از سوسپانسیون باکتری‌ها به ناحیه ریشه هر گیاهچه محلول‌پاشی انجام شد. شرایط دمایی گلخانه در روز ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد و شب ۲±۱۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در روز و ۶۰ درصد در شب بود. برخی خصوصیات آب مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

شرایط کشت

ابتدا بذور پیش تیمار شده و بدون پیش تیمار (شاهد)، درون گلدان‌های کوچک حاوی پرلایت کشت و پس از ۷۲ ساعت بذور شروع به جوانه‌زنی نمودند. گلدان‌ها به‌مدت یک هفته با آب مقطر آبیاری و به‌مدت سه هفته با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. پس از ظهور ۴ برگ اصلی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های مشبک منتقل گردیدند، سپس در محلول غذایی هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950) به‌صورت شناور قرار گرفتند (جدول ۲). این آزمایش متشکل از ۶ مخزن بسته و مستقل به ابعاد ۹۰×۴۰× ۲۵ سانتی‌متر و به‌طور میانگین دارای ۶۳ لیتر محلول غذایی بود. در هر مخزن دو پمپ هوا با قدرت ۸ لیتر در دقیقه برای هوادهی کافی و هم زدن محلول غذایی تعبیه شد. pH و هدایت الکتریکی یک روز در میان اندازه‌گیری و به‌ترتیب ۰/۲± ۵/۸ و ۰/۲± ۲ دسی‌زیمنس بر متر در طول آزمایش به‌طور تقریبی حفظ شد.

صفات مورد ارزیابی

۴۰ روز پس از انتقال نشاء به مخزن‌های حاوی محلول غذایی، بوته‌ها برداشت و وزن تر بوته با ترازوی دیجیتال با دقت یک صدم اندازه‌گیری شد. تعداد برگ در هر بوته هنگام برداشت شمارش گردید.

محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئید به روش آرنون (Arnon, 1967) اندازه‌گیری شد. میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۳، ۶۴۵، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از معادله‌های زیر بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر به‌ترتیب میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید محاسبه شدند. A میزان جذب در طول موج‌های مورد نظر، V حجم نهایی بر حسب میلی‌لیتر و W وزن نمونه بر حسب گرم است.

$$\text{Chlorophyll a (mg g}^{-1}\text{ FW)} = [12.7\,(A_{663}) - 2.69\,(A_{645})] \times V/(W\times1000)$$

$$\text{Chlorophyll b (mg g}^{-1}\text{ FW)} = [22.9\,(A_{645}) - 4.68\,(A_{663})] \times V/(W\times1000)$$

$$\text{Total Chlorophyll (mg g}^{-1}\text{ FW)} = [(20.2\,(A_{645}) + 8.02\,(A_{663})] \times V/(W\times1000)$$

$$\text{Carotenoids (mg g}^{-1}\text{ FW)} = [7.6(A_{480}) - 1.49(A_{510})] \times V/(W\times1000)$$

میزان آنتوسیانین برگ با روش واگنر (Wagner, 1979) اندازه‌گیری شد. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. در این معادله (A) مقدار جذب، (Ɛ) ضریب خاموشی معادل ۳۳۰۰۰ مول بر سانتی‌متر، (b) عرض کوت و (c) مقدار آنتوسیانین را نشان می‌دهد.

$$A = \varepsilon bc$$

به‌منظور اندازه‌گیری غلظت آهن در اندام هوایی، ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه خشک و پس از آن آسیاب شدند. آماده‌سازی عصاره به روش هضم تر انجام شد و غلظت آهن با استفاده از دستگاه جذب اتمی قرائت گردید. محتوای فنول کل برگ با معرف فولن-سیکالتو تعیین شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک غلظت محتوای فنول کل محاسبه شد (Sonald & Laima, 1999). میزان فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم‌کلرید اندازه‌گیری شد. میزان جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت و محتوای فلاونوئید نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین متانولی بدست آمد (Zhishen *et al.*, 1999).

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 26.0، مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودارها با نرم‌افزار GraphPad Prism 8.4.3 انجام شد.

1- Colony forming unit

نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۳). به‌طور کلی تیمارهای باکتریایی موجب افزایش میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۱). بیشترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در تیمار باکتری ترکیبی مشاهده شد. بیشترین محتوای کاروتنوئید با اعمال تیمارهای باکتری ترکیبی و باکتری پانتوآگلومرانس بدست آمد. کاربرد تیمار باکتری ترکیبی در شرایط آبکشت، موجب افزایش ۳۸۸/۲ درصد کلروفیل a، ۴۳۹/۸ درصد کلروفیل b، ۳۹۸/۳ درصد کلروفیل کل و ۲۴۶/۳ درصد محتوای کاروتنوئید، نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۱).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۱ و ۳)، افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و پارامترهای رشد با کاربرد باکتری‌های محرک رشد در گیاه کاهو در شرایط آبکشت می‌توان بیان داشت، باکتری‌های محرک رشد به‌دلیل تولید سیدروفورها موجب افزایش جذب آهن توسط ریشه شده و همچنین با افزایش فراهمی و انتقال نیتروژن، پتاسیم و فسفر، علاوه بر افزایش سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی، باعث افزایش فتوسنتز و تحریک رشد شده اند. افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی اعم از محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهان مختلف با کاربرد باکتری‌های محرک رشد در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است (Zeinali Bafghi *et al.*, 2020; Turan *et al.*, 2014). از طرفی مطالعات نشان داده است، کمبود مقدار آهن در گیاهان علاوه بر ایجاد کلروز و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز و پراکسیداز می‌شود، زیرا ساختار این آنزیم‌ها دارای آهن پورفیرین می‌باشند (Esnaashari & Enteshari, 2018). کمبود آهن در گیاهان موجب کاهش سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل و برخی کاروتنوئیدها در برگ می‌گردد (Fathi amirkhiz *et al.*, 2015). با توجه به نتایج بدست آمده در گیاهان شاهد می‌توان علت کاهش سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به گیاهانی که با باکتری‌های محرک رشد تلقیح یافته بودند، کاهش مقدار جذب آهن توسط گیاه بیان داشت. نتایج مشابهی در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه کاهو با کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط کشت خاکی گزارش شده است (Biswas *et al.*, 2013)، که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌نماید.

جدول ۱- غلظت کاتیون‌ها و آنیون‌های آب مورد استفاده (میلی‌گرم در لیتر)

Table 1- The concentration of cations and anions of the used water ($mg.l^{-1}$)

pH	EC ($dS.m^{-1}$)	منیزیم Magnesium	نیترات Nitrates	بی‌کربنات $HCO3^-$	کلریدها Chlorides	سولفات‌ها $SO4^{2-}$	کلسیم Calcium	آهن Fe	پتاسیم Potassium	سدیم Sodium
7.2	0.18	22.5	2.4	12	4.2	88.3	0.99	0.09	0.1	1.3

جدول ۲- ترکیب یونی محلول غذایی مورد استفاده (میلی‌گرم در لیتر)

Table 2- The ionic composition of the studied nutrient solution ($mg.l^{-1}$)

NO_3^-	SO_4^{-2}	$H_2PO_4^-$	K^+	Ca^{+2}	Mg^{+2}	NH_4^+
651	147	73.5	175.5	120	36	13.5

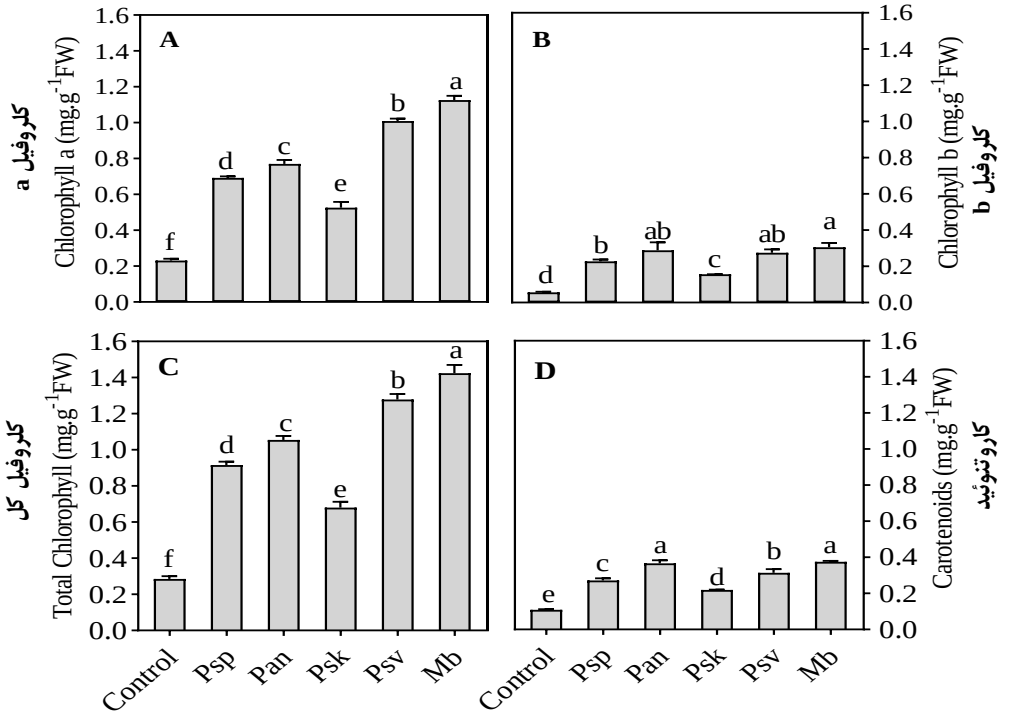
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی در کاهو رقم 'New Red Fire'

Table 3- ANOVA for the effect of plant growth promoting rhizobacteria application on the photosynthetic pigments of lettuce cv. 'New Red Fire'

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares			
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoids
تیمار Treatment	5	0.31**	0.02**	0.51**	0.03**
خطا Error	12	0.001	0.001	0.002	0.000
ضریب تغییرات C.V (%)	-	9.96	10.31	9.81	8.23

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: Significance at the 1% of probability level



شکل ۱- اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی

کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) در کاهو رقم ‘New Red Fire’. Psp: *سودوموناس پوتیدا*، Pan: *پانتوآگلومرانس*، Psk: *سودوموناس کورینسیس*، Psv: *سودوموناس ونکورنسیس*، Mb: *سودوموناس کورینسیس* + *سودوموناس ونکورنسیس* + *سودوموناس پوتیدا* + *پانتوآگلومرانس*.

Figure 1- The effect of plant growth promoting rhizobacteria application on the photosynthetic pigments

Chlorophyll a (A), Chlorophyll b (B), Total chlorophyll (C), and Carotenoids (D) of lettuce cv. ‘New Red Fire’. Psp: *Ps. putida*, Pan: *Pantoea agglomerans*, Psk: *Ps. koreensis*, Psv: *Ps. vancouverensis*, Mb: *Ps. putida* + *Pantoea agglomerans* + *Ps. koreensis* + *Ps. vancouverensis*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

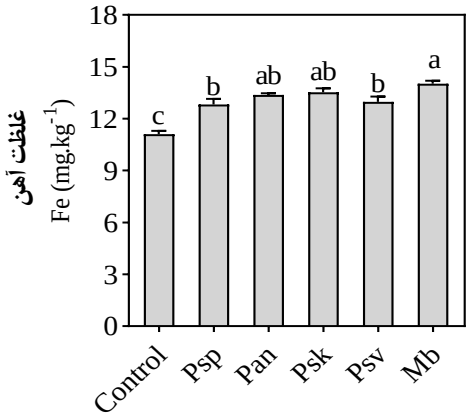
غلظت آهن در اندام هوایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر غلظت آهن در اندام هوایی، در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۴). به‌طور کلی کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت موجب افزایش معنی‌دار غلظت آهن نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۲). حداکثر غلظت آهن در اندام هوایی با کاربرد تیمار باکتری ترکیبی حاصل شد که نسبت به گیاهان شاهد، ۲۶/۲ درصد افزایش غلظت آهن در اندام هوایی بدست آمد. کمترین مقدار غلظت آهن در گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۲). باکتری‌های محرک رشد با تولید سیدروفورها موجب کلات کردن آهن و ورود آن به داخل سلول‌های گیاه میزبان از طریق ترکیبات آلی با وزن مولکولی پایین و لینگاندهای شیمیایی با میل اختصاصی و ترکیبی بالا برای پیوند شدن با آهن III می‌شوند (Cézard *et al.*, 2015; Cunrth *et al.*, 2015). افزایش جذب آهن با کاربرد باکتری باسیلوس در گیاه بادام‌زمینی (Liu *et al.*, 2017)، باکتری *Providencia* sp. در گیاه گندم (Rana *et al.*, 2012)، آنتروباکتر در گیاه سویا (Ramesh *et al.*, 2014)، باکتری سودوموناس در گیاه عدس (Mishra *et al.*, 2011) و گیاه ذرت (Alipour & Sobhanipour, 2012) گزارش شده است. همسو با نتایج بدست آمده، قدم‌خانی و همکاران (Ghadamkhani *et al.*, 2017) بیان کردند بیشترین مقدار آهن قابل جذب در گیاه گندم با کاربرد ترکیبی باکتری‌های محرک رشد حاصل شد، که نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر را تأیید می‌نماید.

وزن تر بوته و تعداد برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر وزن تر بوته در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۴). به‌طور کلی اعمال تیمارهای باکتریایی در شرایط آبکشت موجب افزایش معنی‌دار وزن تر بوته نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۳). حداکثر وزن تر بوته با کاربرد تیمار باکتری ترکیبی (افزایش ۴۲/۶ درصد) نسبت به گیاهان شاهد بدست آمد، کمترین وزن تر بوته در گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر میزان تعداد برگ اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۴). بیشترین تعداد برگ در بوته با کاربرد تیمار باکتری ترکیبی حاصل شد که نسبت به گیاهان شاهد ۲۲/۲ درصد، تعداد برگ در بوته افزایش یافت (شکل ۳). باکتری‌های محرک رشد از طریق سنتز اسیدهای آلی و کاهش pH، موجب افزایش جذب عناصر غذایی و همچنین با افزایش تولید هورمون‌های محرک رشد از جمله ایندول استیک اسید و جیبرلین موجب گسترش سیستم ریشه‌ای و با محدودیت در جذب کلر و سدیم، رشد گیاه میزبان را بهبود می‌بخشند (Erturk *et al*., 2011; Tsavkelova *et al*., 2005). با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها و افزایش پارامترهای رشد از جمله افزایش وزن تر بوته و تعداد برگ با کاربرد تیمارهای باکتریایی در شرایط آبکشت می‌توان بیان داشت؛ باکتری‌های مورد آزمایش با افزایش معنی‌دار سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ موجب افزایش فرآیند فتوسنتز و سوخت و ساز در گیاه میزبان و همچنین موجب تحریک رشد، افزایش تقسیم سلولی و پارامترهای رشد شده است. افزایش معنی‌دار وزن تر بخش هوایی گیاه کلم با کاربرد باکتری‌های محرک رشد (Abdollahi *et al*., 2020)، تأثیر معنی‌دار بر عملکرد وزن تر و خشک، غلظت روی و آهن بخش هوایی گیاه اسفناج با تلقیح باکتری‌های سودوموناس (Bolhasani *et al*., 2020) در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است، که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌نماید.



شکل ۲- اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر غلظت آهن در اندام هوایی کاهو رقم 'New Red Fire'

Psp: *سودوموناس پوتیدا*، Pan: *پانتوآگلومرانس*، Psk: *سودوموناس کورینسیس*، Psv: *سودوموناس ونکورنسیس*، Mb: *سودوموناس کورینسیس* + *سودوموناس ونکورنسیس* + *سودوموناس پوتیدا* + *پانتوآگلومرانس*.

Figure 2- The effect of plant growth promoting rhizobacteria application on Fe concentration in aerial organs of lettuce cv. 'New Red Fire'

Psp: *Ps. putida*, Pan: *pantoea agglomerans*, Psk: *Ps. koreensis*, Psv: *Ps. vancouverensis*, Mb: *Ps. putida* + *pantoea agglomerans* + *Ps. koreensis* + *Ps. vancouverensis*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر برخی صفات فیزیولوژیکی و موفولوژیکی در کاهو رقم 'New Red Fire'

Table 4- ANOVA for the effect of plant growth promoting rhizobacteria application on some physiological and morphological traits of lettuce cv. 'New Red Fire'

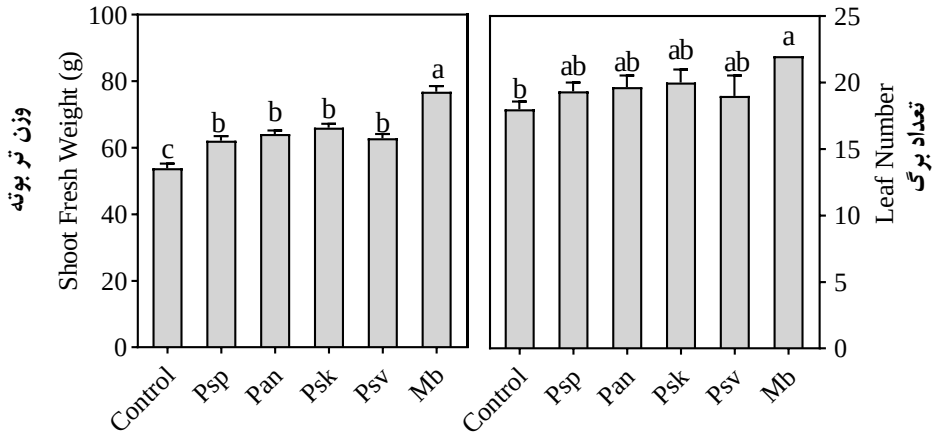
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of squares					
		آهن Fe	آنتوسیانین Anthocyanin	وزن تر بوته Shoot fresh weight	تعداد برگ Leaf number	فنول کل Total phenol	فلاونوئید کل flavonoids Total
تیمار Treatment	5	3.05**	185.42**	166.06**	5.33ns	61637.42**	4723.65**
خطا Error	12	0.17	0.46	5.35	2.44	130.33	16.39
ضریب تغییرات C.V (%)	-	1.83	14.78	2.65	2.17	13.08	6.73

ns، **: به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

ns, **: Non-significant and significant at the 1% of probability level, respectively.

محتوای فنول و فلاونوئید کل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر محتوای فنول و فلاونوئید کل در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۴). به‌طور کلی کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت موجب کاهش معنی‌دار محتوای فنول و فلاونوئید کل نسبت به گیاهان شاهد شد، بیشترین مقدار محتوای فنول و فلاونوئید کل در گیاهان شاهد و کمترین مقدار محتوای فنول و فلاونوئید کل با اعمال باکتری *سودوموناس ونکورنسیس* حاصل شد (شکل ۴).

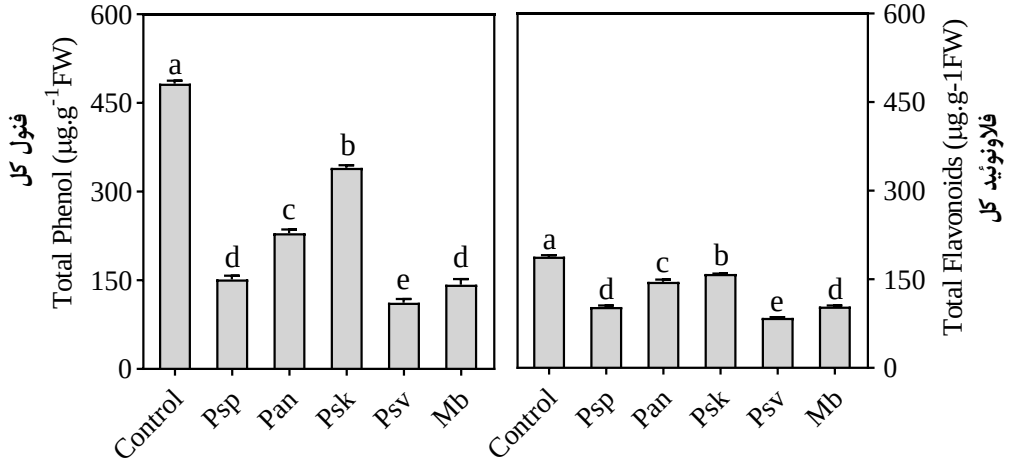


شکل ۳- اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر وزن تر بوته و تعداد برگ در کاهو رقم New Red Fire'

Psp: *سودوموناس پوتیدا*، Pan: *پانتوآگلومرانس*، Psk: *سودوموناس کورینسیس*، Psv: *سودوموناس ونکورنسیس*، Mb: *سودوموناس کورینسیس* + *سودوموناس ونکورنسیس* + *سودوموناس پوتیدا* + *پانتوآگلومرانس*.

Figure 3- The effect of plant growth promoting rhizobacteria application on the shoot fresh weight and leaf number of lettuce cv. 'New Red Fire'

Psp: *Ps. putida*, Pan: *pantoea agglomerans*, Psk: *Ps. koreensis*, Psv: *Ps. vancouverensis*, Mb: *Ps. putida* + *pantoea agglomerans* + *Ps. koreensis* + *Ps. vancouverensis*. (DMRT, $p \leq 0.05$)



شکل ٤- اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر محتوای فنول کل و فلاونوئید کل در کاهو رقم 'New Red Fire'

Psp: *سودوموناس پوتیدا*، Pan: *پانتوآگلومرانس*، Psk: *سودوموناس کورینسیس*، Psv: *سودوموناس ونکورنسیس*، Mb: *سودوموناس کورینسیس* + *سودوموناس ونکورنسیس* + *سودوموناس پوتیدا* + *پانتوآگلومرانس*.

Figure 4- The effect of plant growth promoting rhizobacteria application on total phenol and total flavonoids content of lettuce cv. 'New Red Fire'

Psp: *Ps. putida*, Pan: *pantoea agglomerans*, Psk: *Ps. koreensis*, Psv: *Ps. vancouverensis*, Mb: *Ps. putida* + *pantoea agglomerans* + *Ps. koreensis* + *Ps. vancouverensis*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

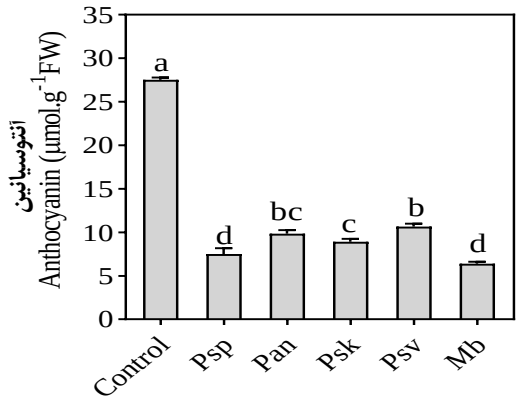
ترکیبات فنولی از جمله ترکیبات آلی در گیاهان هستند که به‌دلیل وزن مولکولی کم و ساختار محلول در آب، موجب تنظیم فشار اسمزی در تنش‌ها می‌گردند. همچنین دارای توانایی پاکسازی رادیکال‌های آزاد به‌طور ویژه‌ای می‌باشند (Chishaki & Horiguchi, 1997). مطالعات پیشین نشان داده است، در شرایط کاهش جذب آهن برای گیاهان، فعالیت آنزیم‌های گایاکول‌پراکسیداز، کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز در اندام هوایی و ریشه کاهش و میزان پراکسیداسیون لیپیدها در بخش هوایی و هیدروژن پراکسید در ریشه افزایش می‌یابد (Sun *et al.*, 2016; Kiani Chalmardi *et al.*, 2012). بر این اساس شاید بتوان گفت گیاهان شاهد به دلیل کاهش جذب آهن نسبت به گیاهان تحت تیمارهای باکتریایی در شرایط کمبود جذب آهن بوده‌اند و کمبود آهن باعث ایجاد اختلال در ساختار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده است، به همین علت ترکیبات فنولی برای جبران کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته‌اند. آنزیم‌ها در ساختار خود دارای آهن پورفیرین می‌باشند و به عنوان گروه‌های پروستتیک، نقش بسیار مهمی را در متابولیسم‌های گیاهی ایفا می‌نمایند (Bannister *et al.*, 1987). افزایش سنتز ترکیبات فنولیک از نشانه‌های انعطاف‌پذیری متابولیکی گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی و تغذیه‌ای می‌باشد (Ferreira *et al.*, 2015; Kallala *et al.*, 2018). قشلاقی و همکاران (Gheshlaghi *et al.*, 2019) گزارش کردند محلول‌پاشی آهن در گیاه یونجه موجب کاهش معنی‌دار محتوای فنول کل و فلاونوئید کل گردید. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش و همسویی آن با تحقیقات پیشین می‌توان بیان داشت مقدار آهن قابل جذب در گیاه، به‌طور معنی‌داری بر محتوای ترکیبات فنولیک اثر دارد.

محتوای آنتوسیانین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت بر محتوای آنتوسیانین در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۴). به‌طور کلی کاربرد تیمارهای باکتریایی در شرایط آبکشت موجب کاهش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین برگ نسبت به گیاهان شاهد گردید و بیشترین مقدار محتوای آنتوسیانین برگ (۲۷/۵۴μmol g^{-1}FW) در گیاهان شاهد حاصل شد (شکل ۵). آنتوسیانین‌ها از جمله ترکیبات فنولی در گیاهان می‌باشند (Khoo *et al.*, 2017). محققین تجمع آنتوسیانین‌ها را در گیاهان بیشتر در شرایط کاهش جذب نیتروژن گزارش کرده‌اند و علت را جایگزینی مصرف کربوهیدرات‌ها جهت سنتز رنگیزه‌های آنتوسیانین به جای متابولیسم نیتروژن بیان داشته‌اند (Taiz & Zeiger, 2010). کاهش جذب عناصر غذایی در محیط ریشه موجب افزایش ترکیبات فنولی در گیاهان می‌گردد (Widodo *et al.*, 2010). تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد، موجب افزایش جذب عناصر غذایی توسط ریشه و بهبود دسترسی به عناصر غذایی توسط گیاه میزبان می‌شود. علاوه بر این، باکتری‌های محرک رشد با تولید سیدروفورها موجب افزایش جذب و انتقال عنصر آهن در گیاهان می‌گردد. آهن از جمله ترکیبات فعالی می‌باشد که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان از قبیل تنفس میتوکندریایی، فتوسنتز، بیوسنتز هورمون‌ها، آسیمیلاسیون عنصر نیتروژن، حفاظت اسمزی و همچنین از بین بردن انواع اکسیژن فعال تأثیر می‌گذارد (Hansch & Mendel, 2009). همسو با نتایج بدست آمده در این پژوهش، افزایش سنتز ترکیبات فنولی در شرایط کمبود آهن در گیاه سورگوم نیز گزارش شده است (Saboora & Behjati, 2017)، که نتایج بدست آمده در این تحقیق از جمله سنتز بیشتر ترکیبات فنولی و محتوای آنتوسیانین در گیاهان شاهد را تأیید می‌نماید.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت از یک سو موجب افزایش معنی‌دار جذب آهن، سنتز حداکثری رنگیزه‌های فتوسنتزی و متعاقبا تحریک رشد و افزایش پارامترهای رشد و عملکرد از جمله وزن تر بوته و تعداد برگ در گیاه کاهو رقم ‘New Red Fire’ گردید، از سوی دیگر در این آزمایش با توجه به تسهیل شرایط رشد و افزایش جذب عناصر غذایی برای گیاهان میزبان در اثر تلقیح با باکتری‌های محرک رشد در شرایط آبکشت، سنتز ترکیبات فنولیکی از جمله محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. لذا بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان از باکتری‌های محرک رشد در گیاه کاهو رقم ‘New Red Fire’ جهت افزایش پارامترهای رشد، عملکرد و غلظت آهن در شرایط آبکشت استفاده نمود. البته اگر بتوان با اعمال راهکارهایی به‌صورت همزمان کیفیت تغذیه‌ای کاهو به‌ویژه محتوای ترکیبات فنولیکی و فلاونوئیدی گیاه را نیز افزایش داد بسیار مطلوب‌تر خواهد بود. در کل انجام تحقیقات بیشتر برای یافتن راهکارهای زیستی به‌منظور افزایش عملکرد و کیفیت تغذیه‌ای کاهو و سایر گیاهان برای کاهش مصرف نهاده‌های شیمیایی و استفاده بهینه منابع آبی در شرایط آبکشت، پیشنهاد می‌گردد.



شکل ۵- اثر کاربرد باکتری‌های محرک رشد بر محتوای آنتوسیانین در کاهو رقم‌'New Red Fire'

Psp: *سودوموناس‌پوتیدا*، Pan: *پانتوآگلومرانس*، Psk: *سودوموناس‌کورینسیس*، Psv: *سودوموناس‌ونکورنسیس*، Mb: *سودوموناس‌کورینسیس* + *سودوموناس‌ونکورنسیس* + *سودوموناس‌پوتیدا* + *پانتوآگلومرانس*.

Figure 5- The effect of plant growth promoting rhizobacteria application on anthocyanin content of lettuce cv. 'New Red Fire'

Psp: *Ps. putida*, Pan: *pantoea agglomerans*, Psk: *Ps. koreensis*, Psv: *Ps. vancouverensis*, Mb: *Ps. putida* + *pantoea agglomerans* + *Ps. koreensis* + *Ps. vancouverensis*. (DMRT, $p \leq 0.05$)

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های گروه علوم باغبانی، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان و همچنین از کارشناس واحد تحقیق و توسعه شرکت زیست فناور سبز جناب آقای مهندس پژمان قاسمی‌نژاد جهت همکاری‌های لازم در انجام این پژوهش، قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Abdollahi, S., Golchin, A., & Shahryari, F. (2020). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on organic acids production and concentration of lead and cadmium in cabbage. *Journal of Water and Soil*, *34*(3), 737-754. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jsw.v34i3.85068
2. Alipour, Z.T., & Sobhanipour, A. (2012). The effect of *Thiobacillus* and *Pseudomonas fluorescent* inoculation on maize growth, and Fe uptake. *Annals of Biological Research*, *3*(3), 1661-1666.
3. Arnon, A.N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, *23*, 112-21.
4. Bannister, J.V., Bannister, W.H., & Rotills, G. (1987). Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, *22*, 111-180. https://doi.org/10.3109/10409238709083738
5. Biswas, J.C., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., Yanni, Y.G., & Rolfe, B.G. (2013). Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, *92*, 880-886. https://doi.org/10.2134/agronj2000.925880x
6. Bolhasani, Z., Ronaghi, A.M., Ghasemi, R., & Zarei, M. (2020). Influence of growth promoting rhizobacteria and organic matter on the concentration of micronutrients of spinach in a calcareous soil affected by salinity. *Iranian Journal of Soil Research*, *34*(1), 81-94. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijsr.2020.122143
7. Cézard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2015). Chemistry and biology of pyoverdines, Pseudomonas primary siderophores. *Current Medicinal Chemistry*, *22*(2), 165-186. https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624
8. Chishaki, N., & Horiguchi, T. (1997). Responses of secondary metabolism to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition*, *43*, 987-991.
9. Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimmann, C., Guillon, L., & Schalk, I.J. (2015). A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *17*(1), 171-185. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12544
10. Ding, J., Zhang, Y., Zhang, H., Li, X., Sun, Z., Liao, Y., Xia, X., Zhou, Y., Shi, K., & Yu, J. (2014). Effects of *Fusarium oxysporum* on rhizosphere microbial communities of two cucumber genotypes with contrasting Fusarium wilt resistance under hydroponic condition. *European Journal* of *Plant Pathology*, *140*(4), 643-653. https://doi.org/10.1007/s10658-014-0494-6
11. Erturk, Y., Cakmakci, R., Duyar, O., & Turan, M. (2011). The effects of plant growth promoting rhizibacteria on vegetative growth and leaf nutrient contents of hazelnut seedling (Turkish hazelnut CV. Tombul and Sivir). *International Journal of Soil Science*, *6*(3), 188-198. https://doi.org/10.3923/ijss.2011.188.198

12. Esnaashari, E., & Enteshari, S. (2018). Effects of iron chloride, iron chelate and nano-iron on enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms in melissa officinalis under aluminum treatment. *Journal of Plant Process and Function*, *7*(23), 193-204. (In Persian with English abstract)
13. Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, *124*, 62-66. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012
14. Fathi Amirkhiz, K., Amini Dehaghi, M., & Heshmati, S. (2015). Study the effect of iron chelate on Chlorophyll content, photochemical efficiency and some biochemical traits in Safflower under deficit irrigation condition. *Iranian Journal of Field Crop Science*, *46*(1), 137-145. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22059/ijfcs.2015.54053
15. Ferreira, J., Cornacchione, M., Liu, X., & Suarez, D. (2015). Nutrient composition, forage parameters, and antioxidant capacity of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in response to saline irrigation water. *Journal of Agriculture*, *5*, 577-597. https://doi.org/10.3390/agriculture5030577
16. Ghadamkhani, A., Enayatizamir, N., & Norouzi Masir, M. (2017). Effect of plant growth promoting bacteria on soil available iron and its uptake by wheat. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *8*(2), 53-64. (In Persian)
17. Gheshlaghi, Z., Khorassani, R., Kafi, M., & Fotovat, A. (2019). Comparison of foliar and soil Fe fertilization on medicago scutellata physiological-biochemical characteristics and active iron in soils containing different amounts of lime. *Journal of Crop Production and Processing*, *9*(4), 113-128. (In Persian)
18. Gupta, A., Gopal, M., Thomas, G.V., Manikandan, V., Gajewski, J., Thomas, G., Seshagiri, S., Schuster, S.C., Rajesh, P., & Gupta, R. (2014). Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *PLoS One*, *9*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104259
19. Hansch, R., & Mendel, R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, and Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, *12*, 259-266. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006
20. Hoagland, D.R., & Arnon, D.I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Circular*, *347*, 39.
21. Kallala, N., Wissal, M., Jelali, K., Kais, Z., & Mhadhbi, H. (2018). Inoculation with efficient nitrogen fixing and indoleacetic acid producing bacterial microsymbiont enhance tolerance of the model legume *Medicago truncatula* to iron deficiency. *Biomedicine Research International*, 1-14. https://doi.org/10.1155%2F2018%2F9134716
22. Khoo, H., Azlan, A., Tang, S., & Lim, S. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins colored pigments as food, pharmaceutical ingredients and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, *61*(1), 1361779. https://doi.org/10.1080%2F16546628.2017.1361779
23. Kiani Chalmardi, Z., Abdolzadeh, A., & Sadeghipour, H.R. (2012). Evaluation of the effects of silicon nutrition on alleviation of iron deficiency in rice plants (*Oriza sativa* L.) with emphasis on growth and antioxidant enzymes activity. *Journal of Plant Biology*, *4*(14), 61-74. (In Persian with English abstract)
24. Kim, M.J., Moon, Y., Kopsell, D.A., Park, S., Tou, J.C., & Waterland, N.L. (2016). Nutritional value of Crisphead 'Iceberg' and Romaine lettuces (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural Science*, *8*(11), 1. https://doi.org/10.5539/jas.v8n11p1
25. Kobayashi, T., & Nishizawa, N.K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 131-152. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522
26. Kumar, P.G., Suseelendra, D., Amalraj, E.L.D., & Reddy, G. (2015). Isolation of fluorescent *Pseudomonas* spp. from diverse agro-ecosystems of India and characterization of their PGPR traits. *Journal of Bacteriology*, *5*, 13-24.
27. Lee, S., Ahn, I., Sim, S., Lee, S., Seo, M., Kim, S., Park, S., Lee, Y., & Kang, S. (2010). *Pseudomonas* sp. LSW25R, antagonistic to plant pathogens, promoted plant growth, and reduced blossom-end rot of tomato fruits in a hydroponic system. *European Journal* of *Plant Pathology*, *126*(1), 1-11. https://doi.org/10.1007/s10658-009-9514-3
28. Liu, D., Yang, Q., Ge, K., Hu, X., Qi, G., Du, B., Liu, K., & Ding, Y. (2017). Promotion of iron nutrition and growth on peanut by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus* sp. strains in calcareous soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-15. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.006
29. Lommen, W.J.M. (2007). The canon of potato science: 27. Hydroponics. *European Potato Journal*, *50*, 3-4.
30. Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review* of *Microbiology-Nature*, *63*(1).
31. Mahfouz, S.A., & Sharaf- Eldin, A. (2007). Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *International Agrophysics*, *2*, 361-366. https://doi.org/10.1055/s-2007-987419
32. Manzocco, L., Foschia, M., Tomasi, N., Maifreni, M., Costa, L.D., Marino, M., Cortella, G., & Cesco, S. (2011). Influence of hydroponic and soil cultivation on quality and shelf life of ready-to-eat lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr). *Journal* of the *Science* of *Food* and *Agriculture*, *91*, 1373-1380. https://doi.org/10.1002/jsfa.4313

33. Mishra, P.K., Bisht, S.C., Ruwari, P., Joshi, G.K., Singh, G., Bisht, J.K., & Bhatt, J.C. (2011). Bioassociative effect of cold tolerant *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-PR1 on iron acquisition, nutrient uptake and growth of lentil (*Lens culinaris* L.). *European Journal of Soil Biology*, *47*, 35-43. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.005
34. Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., & Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, *8*(3), 199-216. https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8
35. Rahi, A. (2016). Effect of supernitroplas and biosuprophosphate biofertilizers on morphological and physiological traits of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Science and Technology of Greenhouse Cultivation*, *7*(26), 135-125. https://doi.org/10.18869/acadpub.ejgcst.7.2.125
36. Rana, A., Saharan, B., Nain, L., Prasanna, R., & Shivay, Y.S. (2012). Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil science and Plant Nutrition*, *58*(5), 573-582. https://doi.org/10.1080/00380768.2012.716750
37. Ramesh, A., Sharma, S.K., Sharma, M.P., Yadav, N., & Joshi, O.P. (2014). Plant growth-promoting traits in *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* MDSR9 isolated from soybean rhizosphere and its impact on growth and nutrition of soybean and wheat upon inoculation. *Agricultural Research*, *3*(1), 53-66.
38. Saboora, A., & Behjati, R. (2017). The effect of boron and iron deficiency on the contents of photosynthetic pigments, carbohydrates and phenolic compounds in two cultivars of *Sorghum bicolor* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, *9*(3), 18-38. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22108/ijpb.2017.103432.1015
39. Sharma, A., Shankhdar, D., & Shankhdhar, S.C. (2013). Enhancing grain iron content of rice by the application of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil Environment*, *59*, 89-94. https://doi.org/10.17221/683/2012-PSE
40. Singh, J.S., Pandey, V.C., & Singh, D.P. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *140*, 339-353. https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017
41. Sonald, S.F., & Laima, S.K. (1999). Phenolics and cold tolerance of brassica napus. *Journal of Plant Agriculture*, 1-5.
42. Stegelmeier, A.A., Rose, D.M., Joris, B.R., & Glick, B.R. (2022). The use of PGPB to promote plant hydroponic growth. *Plants*, *11*, 2783. https://doi.org/10.3390/plants11202783
43. Sun, C., Wu, T., Zhai, L., Li, D., Zhang, X., Xu, X., Ma, H., Wang, Y., & Han, Z. (2016). Reactive oxygen species function to mediate the Fe deficiency response in a Fe-efficient apple genotype: an early response mechanism for enhancing reactive oxygen production. *Frontier in Plant Science*, *7*, 1726. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01726
44. Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5th Ed.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
45. Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., & Netrusoe, A.I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchod roots. *Microbiology*, *74*, 233-273.
46. Turan, M., Ekinci, M., Yildirim, E., Güneş, A., Karagöz, K., Kotan, R., & Dursun, A. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *38*, 327-333. https://doi.org/10.3906/tar-1308-62
47. Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanins in protoplasts. *Plant Physiology*, *64*, 88-93. https://doi.org/10.1104%2Fpp.64.1.88
48. Widodo, B., Broadley, M.R., & Rose, T. (2010). Response to zinc deficiency of two lines with contrasting tolerance is determined by root growth maintenance and organic acid exudation rates and not by zinc-transporter activity. *New Phytologist*, *186*, 400-414. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03177.x
49. Yasufumi, U., & Kaneaki, H. (2003). Selection of PGPR which promotes the growth of spinach. *Japanese Journal of Soil Science* and *Plant Nutrition*, *74*, 157-162. https://doi.org/10.20710/dojo.74.2_157
50. Zandi, P., & Basu, S.K. (2016). Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as bioFertilizers in stabilizing agricultural ecosystems. *Organic Farming for Sustainable Agriculture*, 71-87.
51. Zeinali Bafghi, M., Gholamnezhad, J., Esmaeilzadeh-Hosseini, A.R., Shirmardi, M., & Jafari, A. (2020). Influence of gowth promoting bacteria on gowth and physiological characters of pistachio in saline soils. *Horticultural Plants Nutriton*, *2*(2), 107-129. (In Persian with English abstract)
52. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, *64*, 555-559. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 523-536

Evaluating the Effect of the Rootstock on the Resistance of Some Grafted Pear Cultivars to the Fire Blight Disease

J. Samimi[1], Y. Selahvarzi[2*], A. Tehranifar[3], N. Beikzadeh[4]

1, 2 and 3- Ph.D. Student, Assistant Professor and Professor, Department of Horticultural Science and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Selahvarzi@um.ac.ir)
4- Assistant Professor of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

Received: 23-07-2023
Revised: 01-01-2024
Accepted: 11-04-2024
Available Online: 14-04-2024

How to cite this article:
Samimi, J., Selahvarzi, Y., Tehranifar, A., & Beikzadeh, N. (2024). Evaluating the effect of the rootstock on the resistance of some grafted pear cultivars to the fire blight disease. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 523-536. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.83573.1277

Introduction

Pear (*Pyrus communis* L.) is a cold-climate fruit tree belonging to the Rosaceae family, and it is native to Western Asia and Eastern Europe. Fire blight disease is caused by the gram-negative bacterium *Erwinia amylovora*, and it is considered one of the most damaging and harmful diseases in pome fruit trees in cold and temperate regions worldwide. The most sensitive plant organ in pome fruit trees to this disease is flowers. Fire blight disease has five important stages, from initial infection to the final death of the tree trunk. These five stages include blossom blight, fruit blight, leaf blight, main branches, and trunk blight, and finally, root blight. The first and most important stage of pathogenicity in fire blight disease begins in early spring under high humidity, causing the burning and death of the flower.

Materials and Methods

The Rootstock used in this experiment were Dargazi and Pyrodwarf, and the cultivars studied were Koshia and Dargazi. The experiment was conducted in two conditions, orchard and greenhouse. In the orchard, a factorial experiment was carried out in a completely randomized block design with five repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Koshia and Dargazi). In the greenhouse, a factorial experiment was carried out in a completely randomized design with three repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Dargazi and Kosha). Gardner scale was used to measure the severity of fire blight infection. In addition, the levels of sucrose, sorbitol, and pH in leaf tissue were measured. The sucrose content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf Rootstock increased from day 0 to 6 and reached its highest level (10%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf base, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (8%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi base, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (7%) on the 6th day, then decreased to 4% on the 12th day. The sorbitol content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf base increased from day 0 to 6 and reached its highest level (2%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1.5%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1%) on the 6th day, then decreased to 0.5% on the 12th day. On the other hand, the pH of the leaf tissue in the Dargazi/Pyrodwarf base remained constant at 6.2 from day 0 to 12 and increased to 7.4 on the 12th day.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.83573.1277

Results and Discussion

The rootstock used in this experiment were Dargazi and Pyrodwarf, and the cultivars studied were Koshia and Dargazi. The experiment was conducted in two conditions, orchard and greenhouse. In the orchard, a factorial experiment was carried out in a completely randomized block design with five repetitions. The factors studied were rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Koshia and Dargazi). In the greenhouse, a factorial experiment was carried out in a completely randomized design with three repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Dargazi and Koshia). Gardner scale was used to measure the severity of fire blight infection. In addition, the levels of sucrose, sorbitol, and pH in leaf tissue were measured. The sucrose content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf Rootstocks increased from day 0 to 6 and reached its highest level (10%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (8%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi Rootstock, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (7%) on the 6th day, then decreased to 4% on the 12th day. The sorbitol content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf Rootstock increased from day 0 to 6 and reached its highest level (2%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1.5%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1%) on the 6th day, then decreased to 0.5% on the 12th day. On the other hand, the pH of the leaf tissue in the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock remained constant at 6.2 from day 0 to 12 and increased to 7.4 on the 12th day. The collected data from both orchard and greenhouse experiments were analyzed to determine the effects of Rootstock and cultivar on fire blight resistance.

Conclusion

The results showed that the combination of Koshia/Dargaz had higher resistance to fire blight compared to Koshia/Pyrodwarf. Additionally, the pH and carbohydrate content in the leaf tissue of the rootstock affected the growth and proliferation of fire blight bacteria. This study demonstrated varying levels of resistance to fire blight among the studied combinations, indicating significant potential for breeding and improving pear resistance to this disease. The Dargazi cultivar exhibited very high resistance to fire blight in both orchard and greenhouse conditions. Overall, the resistance of the Dargazi rootstock contributed to the resistance of the sensitive Koshia cultivar.

Keywords: Cultivar, Fire blight disease, Gardner scale, Rootstock, USDA system

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۲۳-۵۳۶

ارزیابی اثر پایه بر میزان مقاومت برخی ارقام گلابی پیوندی به بیماری آتشک

جواد صمیمی رباط[۱]- یحیی سلاح ورزی[۲*]- علی تهرانی فر[۳]- ناصر بیک زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۳

چکیده

باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) یکی از بزرگترین چالش‌ها در تولید میوه گلابی است و فقدان روش‌های کنترل مؤثر، بر نیاز به ارقام مقاوم به این بیماری تأکید می‌کند. بنابراین، آزمایشات تعیین سطوح حساسیت برای ایجاد برنامه‌های اصلاح نژادی که مقاومت در برابر این بیماری را تضمین کند، ضروری است. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر پایه بر میزان مقاومت ارقام گلابی پیوندی به بیماری آتشک و بررسی اثر انتقال مقاومت یا حساسیت به بیماری از پایه‌های مقاوم به ارقام گلابی با سنجش سیستم USDA در باغات گلابی آستان قدس رضوی و باغات نیشابور با دو رقم گلابی (ٔدرگزیٔ و ٔکوشیأ) پیوند شده بر روی دو پایه (ٔدرگزیٔ و ٔپیردوارفٔ) اجرا شد، و مقیاس گاردنر نیز بر روی نهال‌های یکساله در گلخانه بررسی شد، همچنین مجموع قندهای سوربیتول، ساکارز و pH عصاره برگی در روزهای صفر تا ۱۸ پس از آلودگی طی چهار مرحله اندازه‌گیری شد. با القا باکتری مقدار قندها از روز ۶ تا ۱۲ پس از آلودگی در رقم و پایه ٔکوشیأ/ ٔپیردوارفٔ از ۳۰ به ۲۰ میلی‌گرم (۳۳ درصد کاهش قندها) ولی در رقم و پایه ٔکوشیأ/ٔدرگزیٔ از ۳۵ به ۲۵ میلی‌گرم (۲۹ درصد کاهش قندها) و در دو رقم و پایه ٔدرگزیٔ/ٔدرگزیٔ و ٔدرگزیٔ/ٔپیردوارفٔ ثابت ماند. در مورد pH هم، در نهال‌ها با رقم ٔکوشیأ پیوند شده روی پایه ٔدرگزیٔ نیز این روند مشاهده شد. به این ترتیب pH در روزهای صفر، ۳، ۶ و ۱۲ به‌ترتیب برابر ۵/۵، ۶/۵، ۵/۳ و ۵/۲ اندازه‌گیری شد. این در حالی است که در بافت برگ‌های ارقام و پایه‌های ٔدرگزیٔ/ٔپیردوارفٔ و ٔدرگزیٔ/ٔدرگزیٔ این مقدار به‌ترتیب ۵/۵ و ۵/۶ و این روند طی روزهای مختلف تقریبا ثابت بود. نتایج نشان داد که پایه ٔدرگزیٔ تا حدودی اثر مقاومت خود را بر روی رقم حساس ٔکوشیأ گذاشت، به‌طوری‌که میزان مقاومت رقم و پایه ٔکوشیأ/ٔدرگزیٔ بیشتر از میزان مقاومت رقم و پایه ٔکوشیأ/ٔپیردوارفٔ بود. بطور کلی طبق نتایج بدست آمده احتمال می‌رود که پایه مقاوم، مقاومت به بیماری آتشک را تا حدودی به ارقام حساس منتقل نموده است. بنابراین در برنامه بـه‌زراعی گلابـی بـه‌منظور مقاومت به بیماری آتشک می‌توان از پایه مقاوم به بیماری آتشک استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیماری آتشک، پایه، رقم، سیستم USDA، مقیاس گاردنر

مقدمه

گلابی (*Pyrus communis* L.) از درختان میوه سردسیری، و متعلق به خانواده رزاسه بوده و بومی آسیای غربی و اروپای شرقی می باشد (Stošić *et al.*, 2021). بیماری آتشک توسط باکتری گرم منفی *Erwinia amylovora* ایجاد می‌شود و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خسارت‌زا و زیان‌آور در درختان میوه دانه‌دار مناطق سردسیر و معتدله در جهان محسوب می‌شود (Choi *et al.*, 2019; Dagher *et al.*, 2020). حساس‌ترین اندام گیاهی درختان دانه‌دار، نسبت به این بیماری گل‌ها هستند (Mikiciński *et al.*, 2020). بیماری آتشک دارای ۵ مرحله مهم جهت آلوده سازی اولیه تا مرگ نهایی تنه درخت می‌باشد که این پنج مرحله به‌ترتیب شامل سوختگی شکوفه، میوه، برگ، شاخه اصلی و در نهایت مرگ کامل تنه درخت می‌شود. اولین و مهمترین مرحله بیماری‌زایی در بیماری آتشک در اوائل فصل بهار در رطوبت بالا با سوختگی و مرگ شکوفه که مهمترین منبع ورود عامل بیماری به گیاه محسوب می‌شود شروع می‌گردد، زیرا شکوفه سرشار از مواد غذایی مورد نیاز باکتری و روزنه خوبی برای ورود عامل بیماری است به‌دلیل اینکه سرتاسر کلاله پوشیده از بافت‌های کرکی است، سلول‌های واقع در پایه این کرک‌ها

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Selahvarzi@um.ac.ir)
۴- استادیار مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.83573.1277

مایعی سرشار از مواد غذایی ترشح می‌کنند که باکتری‌های ساکن در آن‌ها از این مایع به‌عنوان غذا برای رشد استفاده می‌کنند (Jakab-Ilyefalvi *et al.*, 2012). شناخت علل شیوع بیماری‌های باکتریایی به‌ویژه آن‌هایی که در درختان ایجاد بلایت، نکروز و حالت سوختگی می‌کنند بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد (Khan *et al.*, 2012). این بیماری بافت میوه، برگ، اندام هوایی و گل را آلوده می‌کند، که یک بیماری پیچیده است و تمام چرخه این بیماری در ارتباط نزدیک با گیاه میزبان سپری می‌شود. که قسمت‌های آلوده گیاه باعث تراوش مواد چسبناک و کهربایی حاوی باکتری از سطح آلوده می‌شود (Doolotkeldieva & Bobusheva, 2016). بیشترین خسارت بیماری در درختان گلابی و پس از آن برای سایر درختان دانه‌دار گزارش شده است (Aleksandrova & Dimitrova, 2021; Abdollahi *et al.*, 2004; Azarabadi *et al.*, 2017; Seidghasemi *et al.*, 2014). تعیین حساسیت پایه‌های درختی از اساسی‌ترین مراحل برای کنترل و کاهش بیماری آتشک است. چراکه به عقیده بسیاری از محققان، یکی از مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش های شناخته شده برای کنترل بیماری‌های گیاهی، تولید و کاشت ارقام و پایه‌های متحمل و مقاوم است. به‌همین دلیل استفاده از ارقام مقاوم در برابر آتشک ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از ارقام مقاوم به بیماری آتشک و یا مقاوم کردن ارقام بومی که در هر منطقه کشت می‌شود است، نه تنها به‌طور طبیعی باعث کاهش آلودگی میکروبی در باغات می شود، بلکه هزینه سایر روش‌های مبارزه به بیماری را به‌طور وسیعی کاهش می‌دهد (van der Zwet & Korba *et al.*, 2008; Kei, 1979). با توجه به مطالعات صورت گرفته استفاده از ارقام مقاوم یکی از مهمترین راه‌کارهای توصیه شده برای مبارزه با این بیماری می‌باشد، به‌همین دلیل برای ما مهم است بدانیم که آیا می‌شود از این ارقام به‌عنوان پایه جهت کنترل بیماری آتشک استفاده کرد، به‌عبارت دیگر آیا این فرض را می‌توان اثبات کرد که استفاده از این ارقام به‌عنوان پایه‌هایی که نسبت به بیماری آتشک مقاومت نسبتا خوبی نشان داده مقاومت به بیماری را به ارقام پیوند شده حساس که کیفیت میوه بالاتری دارند القا نموده و تا حد قابل قبولی از حساسیت آنها نسبت به بیماری بکاهند. یکی از روش‌های تعیین خسارت بیماری در باغات سیستم استاندارد USDA است که توسط وزارت کشاورزی ایالات متحده آمریکا پیشنهاد و مورد اجرا قرار گرفته است (Van Der Zwet & Keil, 1979).

بر این اساس یک سیستم درجه‌بندی ساده برای برآورد میزان شدت آلودگی بنام سیستم گروه بندی USDA در برنامه‌های اصلاحی ارقام مختلف درختان میوه گلابی به بیمار آتشک ایجاد شده است، که این سیستم درجه بندی به‌صورت نزولی بوده و از ۱۰ تا ۱ می‌باشد. (Vander Zevit *et al.*, 1970; Salcedo & Matta, 2000; Vander Zevit & Keli, 1979). همچنین از این روش برای ارزیابی بیماری آتشک در ارقام سیب نیز استفاده شده است، که پس از ارزیابی ۸۴ رقم سیب در ایالت میشیگان آمریکا با سیستم سنجش USDA بیان شد که بین این ارقام از لحاظ شدت بیماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد (Thomas & Jones, 1992).

در آزمایش مشابه دیگری، و برای ارقام سیب در ایالت میشیگان با استفاده از این روش، شدت آلودگی ارقام سیب به بیماری باکتریایی آتشک مورد سنجش قرار گرفت (Jones & Thomas, 1992). برای ارزیابی و تعیین پیشرفت بیماری و شدت خسارت آلودگی بیماری در باغات گلابی در مقدونیه در خصوص بیماری آتشک با استفاده از روش USDA اثبات شد، که میزان پیشرفت اولیه علائم و همچنین میزان خسارت به هر رقمی از درختان گلابی چه میزان است. بیشترین میزان خسارت در باغات متراکم گلابی و بر روی ارقام پیوندی مشاهده شد (Ristevski & Ristevska, 1995). مقیاس گاردنر که اساس آن اندازه‌گیری درصد بخش هوایی بلایت شده نهال‌های گلابی کشت شده در گلدان است، به‌عنوان یکی از روش-های متداول جهت تعیین میزان حساسیت ارقام پیوند شده به آتشک می‌باشد. بر طبق این مقیاس، درصد بخش هوایی بلایت شده نهال‌ها پس از تلقیح از طریق محاسبه بخش بلایت شده نسبت به بخش سالم باقیمانده محاسبه و تعیین می‌شود (Şahin *et al.*, 2020). باکتری *E. amylovora* با مصرف کربوهیدرات‌ها انرژی خود را تأمین می‌کند و افزایش کربوهیدرات‌ها در بافت‌های گیاهی باعث جذب بیشتر این باکتری می‌شود. توانایی بیماری‌زایی در باکتری *E. amylovora* به توانایی تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای مخصوص (Bellemann *et al.*, 1994) جهت ایجاد واکنش فوق‌حساسیت[1] در گیاهان غیر میزبان است (Barny *et al.*, 1990). همچنین این باکتری به متابولیسم سوربیتول در گیاهان میزبان نیز نیاز دارد (Aldridge *et al.*, 1997). گیاهان خانواده رزاسه حاوی سوربیتول و ساکارز به‌عنوان منابعی از کربوهیدرات‌های قابل انتقال هستند (Grant & ap Rees, 1981). از سوی دیگر pH سلولی گیاه میزبان نیز روی رشد و تکثیر باکتری آتشک مؤثر است بطوری‌که ماندگاری باکتری در محیط‌کشت در دامنه pH بین ۵ تا ۸/۵ ارزیابی شده است (Billing, 1974; Billing *et al.*, 1961;Ark, 1973). با توجه به اینکه، بیماری آتشک به‌عنوان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار شناخته شده و درخت گلابی از حساس‌ترین میزبان‌های این بیماری محسوب می‌گردد، آزمایش‌های فوق با هدف بررسی تأثیر پایه بر میزان حساسیت و تغییرات بیوشیمیایی برخی ارقام گلابی به بیماری آتشک انجام شد.

1- Hypersensitive

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در مجموعه گلخانه‌های تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و درختان پنج ساله باغات پایه رویشی آستان قدس رضوی مشهد و برخی از باغ‌های شهرستان نیشابور انجام شد. آزمایش در باغ بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی بر روی درختان شامل پایه‌های (درگزی[1] و پیردوارف[2]) و رقم (کوشیا[3] و درگزی) در پنج تکرار اجرا گردید. در گلخانه نیز آزمایشات به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با متغیرهای پایه (درگزی و پیردوارف) و ارقام گلابی (درگزی و کوشیا) در چهار زمان با سه تکرار برای اندازه‌گیری مقیاس گاردنر و نمونه‌برداری برای آزمایشات اندازه‌گیری ساکارز، سوربیتول و pH بود. در هر تکرار یک نهال به‌صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در اسفند ۱۳۹۹، نهال‌های گلابی دوساله که قبلاً پیوند بر روی پایه‌های رویشی انجام شده بود ولی به‌منظور رشد شاخه‌های فرعی در پیوندک، نهال‌های ریشه لخت به گلدان‌های ۲۰ کیلویی حاوی مخلوطی از خاک، ماسه و خاک برگ به نسبت‌های مساوی منتقل و در شرایط گلخانه‌ای (فتوپریود معمولی، دمای ۵ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵-۷۰ درصد دارای سیستم رطوبت‌ساز و خنک‌کننده) نگهداری شدند. به‌منظور تحریک رشد شاخه‌های فرعی، کلیه نهال‌ها پس از انتقال به گلدان و قبل از آلوده‌سازی به باکتری عامل آتشک، از ارتفاع ۷۰ سانتی‌متری سربرداری شدند. دو ماه پس از انتقال، شاخه‌هایی به طول تقریبی ۴۵-۳۰ سانتی‌متر جهت تزریق در نظر گرفته شد.

بررسی میزان آلودگی باغات گلابی به آتشک بر اساس سیستم USDA

تحت شرایط طبیعی آلودگی برا ساس سیستم گروه‌بندی USDA تعداد چهار نوع ترکیب متفاوت شامل دو پایه درگزی (مقاوم به آتشک)، پیردوارف (نیمه مقاوم به آتشک) و دو رقم کوشیا (حساس به آتشک) و درگزی (مقاوم به آتشک)، در باغ نمونه آستان قدس رضوی و برخی از باغ‌های شهرستان نیشابور مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

این روش به گونه‌ای طراحی شده است که بر اساس یک درجه بندی نزولی از ۱۰ تا ۱ و بصورت برآورد چشمی از خسارت می‌باشد. نحوه قرار دادن ترکیب‌های پیوندی مورد تحقیق در هر یک از گروه‌های ده‌گانه براساس شدت خسارت، آلودگی و پیشرفت بیماری در اندام‌های مختلف گیاه بر اساس (جدول ۱) انجام شد (Van Der Zwet & Keil, 1979).

بعد از تعیین درجه‌بندی نزولی ۱۰گانه، میانگین اعداد که شدت آلودگی آتشک را تعیین می‌کند، بر اساس سیستم نمره‌دهی پنجگانه GRIN[4](جدول ۲) به یک درجه‌بندی و یا نمره تبدیل شده که براساس آن می‌توان درختان را در گروه‌های مختلف جای‌گذاری نمود (Thomas & Jones, 1992). تحت شرایط آلودگی با استفاده از سیستم آلودگی USDA در باغات مزرعه نمونه آستان قدس رضوی مشهد و باغات نیشابور تعداد دو رقم گلابی حساس کوشیا و مقاوم درگزی که هر دو بر روی پایه‌های نیمه‌حساس پیردوارف و مقاوم درگزی پیوند شده بررسی شدند.

تزریق عامل بیماری و نمونه‌گیری

باکتری مولد بیماری آتشک (*E. amylovora*) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. به‌منظور آماده سازی مایه تلقیح مورد نیاز، از کشت‌های شب‌گذران[5] باکتری در محیط‌کشت لوریا برتانی براث[6] با کدورت (OD[7]) حدود ۲۰ در دمای ۲۴±۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. غلظت بهینه مایه باکتری با توجه به حداقل احتمال فرار (کمترین غلظت مورد نیاز باکتری که برای ایجاد بیماری‌زایی مناسب است) از بیماری در سرشاخه‌ها بر اساس گزارشات تعیین شد (Sahin *et al*., 2020). به این ترتیب مایه باکتری به میزان یک میلی‌لیتر به ازای هر سرشاخه و با قرار دادن دست و پنبه در زیر سرسرنگ به‌منظور جلوگیری از جاری شدن باکتری در طول شاخه تزریق شد (شکل ۲- (a ,b)). بلافاصله پس از تزریق باکتری، آب‌پاشی سرشاخه‌ها با مه‌پاش حاوی آب مقطر انجام و کف گلخانه به‌مدت یک ماه در طول روز مرطوب نگه داشته شد. همچنین جهت حفظ بهتر رطوبت نایلون‌های پانچ شده در اطراف هر نهال پیچیده شد. رطوبت هوای گلخانه در گرم‌ترین ساعات روز حداقل ۸۰ درصد جهت انتقال و گسترش بیماری در گیاه بود که نهال را مستعد پذیرش باکتری می‌کرد. دمای گلخانه و خصوصاً دمای سطح برگ‌ها با استفاده از آبپاشی متراکم در اواسط روز در محدوده ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. به‌منظور اطمینان از آلودگی شاخه‌ها، تزریق مجدد آنها ۱۲ ساعت بعد از اولین تزریق تکرار شد (شکل ۲-(c)).

1- Dargazi
2- Pyrodwarf
3- Koshia
4- Germplasm resources information network
5- Overnight
6- Luria-Bertani medium
7- Optical density

شکل ۱- بررسی چشمی آلودگی به بیماری در برگ‌ها و شاخه‌های درختان موجود در باغات بر اساس سیستم USDA

Figure 1- Visual examination of disease contamination in leaves and branches of trees in orchards based on the USDA system

جدول ۱- درجه‌بندی نزولی گروه‌های ۱۰ گانه شدت خسارت آتشک در سیستم USDA

Table 2- Descending grading of 10 groups of fire blight damage severity in the USDA system (Oitto *et al*., 1970)

شدت آتشک Fire blight intensity	تعاریف Definitions	گروه Group
0	عدم ظهور علائم آتشک بر روی درخت Absence of fire blight symptoms on the tree	10
1-3	ظهور علائم بیماری فقط بر روی شاخه‌های فصل جاری The appearance of disease symptoms only on the branches of the current season	9
4-6	ظهور علائم بر روی چوب‌های ۱تا ۲ ساله Symptoms appear on 1-2 year old wood	۸
7-12	ظهور علائم بر روی چوب‌های ۳-۱ ساله و بالای ۱/۸ فوقانی درخت Symptoms appear on 1-3-year-old wood and above the upper 1.8 of the tree	7
13-25	ظهور علائم بر روی چوب‌های ۳-۲ ساله و بالای ۱/۴ فوقانی درخت Symptoms appear on 2-3-year-old wood and above the upper 1.4 of the tree	6
26-50	ظهور علائم بر روی چوب‌های ۳ ساله و بر روی ۱/۲ فوقانی درخت Symptoms appear on 3-year-old wood and on the upper 1.2 of the tree	5
51-75	ظهور علائم بر روی چوب‌های پیرتر و پایین ۱/۲ تحتانی درخت Symptoms appear on older wood and lower 1.2 of the tree	4
76-88	ظهور علائم بر روی چوب‌های پیرتر و پایین ۱/۴ تحتانی درخت Symptoms appear on older wood and lower 1.4 of the tree	3
89-99	ظهور علائم روی تنه درخت The appearance of symptoms on the trunk of the tree	2
100	مرگ کامل درخت Complete death of the tree	1

جدول ۲- سیستم نمره‌دهی پنج گانه GRIN و گروه‌های واکنش در مقابل بیماری آتشک (Thomas & Jones, 1992)

Table 3- GRIN five scoring system and reaction groups against fire blight disease (Thomas & Jones, 1992)

مفهوم (گروه) Concept (group)	کد GRIN GRIN code	میانگین گروه شدت آلودگی Average pollution intensity group
خیلی مقاوم Very resistant	1	9.8-10
نیمه مقاوم Semi resistant	2	8.5-9.7
حد واسط Intermediate	3	6.6-4.8
نیمه حساس Semi-sensitive	4	5.1-6.5
خیلی حساس Very sensitive	5	0-5

اندازه‌گیری درصد شاخه‌های دارای علائم سوختگی در نهال‌های گلخانه

میزان حساسیت در ارقام با استفاده از درصد بلایت در بخش هوایی طبق جدول ۳ تعیین شد. طبق این روش پس از تزریق عامل بیماری‌زا به گیاهان درصد شاخه‌ها و بخش‌های هوایی بلایت شده برای هر نهال کشت شده در گلخانه طی روزهای صفر تا هجدهم اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان ساکارز بافت برگ نهال‌های گلخانه‌ای

برای اندازه‌گیری این قند از معرف آنترون استفاده شد، که ۰/۱ گرم بافت برگ با ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن، به پنج میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد. پس از آن نمونه یاد شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت مقدار جذب نور آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد ()Miller, 1959.

اندازه‌گیری مقدار کمی و کیفی سوربیتول بافت برگ نهال های گلخانه‌ای

در این روش ابتدا مقداری از بافت برگ نهال‌های مورد نظر، در لوله یک و نیم میلی‌لیتری لیتری ریخته شد. پس از انجام سانتریفیوژ به‌منظور رسوب سلول‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را با ۴۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط با یک میلی‌لیتر سدیم متاپریودات که در اسیدکلریدریک حل شده، مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس دو میلی‌لیتر رامنوز به آن اضافه شد. مخلوط یاد شده به‌مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سرد کردن، مقدار سوربیتول تولید شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه گیری شد (Bok *et al*., 1977).

سنجش pH بافت برگ نهال‌های گلخانه

میزان تغییرات pH بر میزان تکثیر باکتری در محیط‌کشت و بافت‌های باکتری تأثیرگذار است، بطوری‌که تغییر pH بافت در محیط‌کشت باکتری و همچنین سلول باعث تغییر میزان فعالیت در سلول‌های باکتری می‌شود و این تغییرات باعث کمتر یا بیشتر شدن فعالیت باکتری در محیط اطراف خود می‌گردد. به‌منظور تعیین میزان pH بافت‌ها ابتدا از روز صفر تا ۱۲ پس از آلودگی مقدار برگ‌های تزریق شده عامل بیماری‌زا به نهال‌ها در گلخانه جمع‌آوری شد و بعد از عصاره‌گیری از برگ‌ها بوسیله دستگاه pH متر دیجیتالی میزان pH بافت‌های نمونه‌گیری شده اندازه‌گیری شد. زیرا اندازه‌گیری pH تفاوت در رشد باکتری در محیط‌هایی با اسیدیته مختلف را نمایان می‌کند (Shrestha *et al*., 2005).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از طرح بلوک کامل تصافی در سطح احتمال ۱ درصد با استفاده از نرم‌افزار جامپ و با استفاده از آزمون LSD استفاده شد.

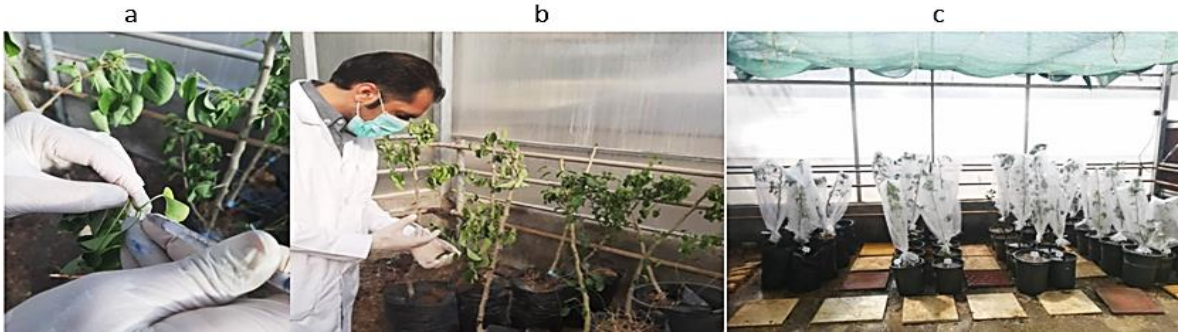
نتایج و بحث

سیستم گروه‌بندی USDA

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) اثرات ساده و متقابل رقم و پایه بر شدت آلودگی ایجاد شده در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. در اوائل و اواسط و اواخر تابستان پس از پایان پیشرفت علائم بیماری و شانکرها روی ارقام و پایه‌های مختلف درختان شدت آلودگی در درختان بر اساس جدول ۲ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از جدول ۵ رقم و پایه کوشیا/درگزی (با میانگین ۸/۶) میزان مقاومت بیشتری را نسبت به رقم و پایه کوشیا/پیردوارف (با میانگین ۲/۵) نشان داد. همچنین بین رقم و پایه درگزی/پیردوارف (با میانگین ۹/۸) و درگزی/درگزی (با میانگین ۱۰) اختلاف معنی‌داری نداشت. بر اساس کد گرین جدول ۵ رقم و پایه کوشیا/پیردوارف نیمه حساس، کوشیا/درگزی نیمه مقاوم و ارقام و پایه‌های درگزی/پیردوارف و درگزی/درگزی خیلی مقاوم نسبت به بیماری آتشک دسته‌بندی شدند. رقم درگزی رقمی مقاوم به بیماری آتشک است و روی هر پایه‌ایی مقاومت خود را حفظ می‌کند حال آنکه اگر به‌عنوان پایه استفاده شود می‌تواند تا حدودی این مقاومت را به رقم حساس کوشیا منتقل کند. در پژوهش‌های مشابه در مقدونیه و ایالت میشیگان آمریکا نیز وجود چنین اختلاف معنی‌داری در بررسی باغات به این روش نسبت به مقاومت به آتشک در ارقام مورد آزمایش گزارش شده است (; Thomas & Jones, 1992Ristevski & Ristevska, 1996).

اندازه‌گیری مقدار حساسیت (درصد بلایت شده)

بعد از مایه‌زنی باکتری، بروز علائم آلـودگی در سرشاخه‌هـا بیانگر موفقیـت آمیز بـودن آلوده‌سازی سرشاخه‌ها بود. علائم بیماری مانند نکروز و بافت پژمرده در برگ‌ها و نوک ساقه مشاهده شد. نهال‌ها سه روز پس از تلقیح قهوه‌ای شدند و آلودگی به سرعت از طریق شاخه‌ها، گره‌ها و دمبرگ‌ها به تمام رگبرگ‌های برگ پیشرفت کرد. بر همین اساس در شاخه‌هایی که تزریق باکتری صورت گرفته بود میزان پیشرفت بیماری در هر شاخه نسبت به طول کل شاخه اندازه‌گیری شد (شکل ۳).



شکل ۲- (a ,b) روش تزریق عامل بیماریزا، (c) شرایط نگهداری نهال‌های گلابی و ایجاد بیماری به گیاهان در گلخانه با حفظ رطوبت

Figure 2- (a,b) The method of injecting the pathogen, *Erwinia amylovora* (c) The conditions of pear seedling maintaining and inducing disease to the plants in the greenhouse with the humidity

جدول ۳- مقیاس گاردنر برای تعیین میزان حساسیت به بلایت نهال‌های گلابی (Şahin *et al*., 2020)

Table 3– Gardner's scale for determining blight sensitivity of pear seedlings (Şahin *et al*., 2020)

سطح حساسیت Sensitivity level	درصد بلایت در بخش هوایی The percentage of blight in the air sector
بسیار مقاوم Very resistant	0-10
مقاوم Resistant	11-30
نسبتاً حساس Relatively sensitive	31-50
حساس Sensitive	51-90
بسیارحساس Very sensitive	91-100

جدول ٤- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر پایه‌های متفاوت بر شدت آلودگی دو رقم گلابی

Table 4- ANOVA (mean square) for the effect of different rootstocks on the contamination intensity of two pear cultivars

منابع تغییرات Sources of change	درجه آزادی Degree of freedom	شدت آلودگی Intensity of pollution
بلوک Block	4	0.006^{ns}
رقم Cultivar	1	16.20**
پایه Rootstock	1	45**
رقم ×پایه Rootstock×Cultivar	1	12.80**
خطای آزمایش Experimental error	16	0.29

اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل ترکیب‌های پیوندی و زمان در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول۶). به این ترتیب علائم بیماری آتشک در رقم و پایه درگزی/درگزی حتی ۱۸ روز پس از تلقیح آلودگی بر روی سرشاخه‌ها مشاهده نشد. اولین علائم آلودگی در روز سوم در رقم کوشیا (بر روی هر دو پایه درگزی و پیردوارف) شناسایی شد (۱۰٪بلایت). در رقم و

پایه درگزی/پیرودوارف، علائم بسیار کمی از آلودگی در روز ششم (۱۰٪ بلایت) ظاهر شد و این میزان تا روز هجدهم پس از آلودگی ثابت ماند. بیشترین میزان آلودگی در رقم و پایه کوشیا/پیردوارف در روز هجدهم (۵۰٪ بلایت) است (جدول ۷). بطور کلی در مقیاس گاردنر طول شاخه‌های بلایت شده (SLB[1]) نسبت به طول کل شاخه در نهال‌هایی که به باکتری آتشک آلوده شده میزان حساسیت یا مقاومت آنها را در برابر آتشک را مشخص می‌کند، که هر چه درصد بلایت در شاخه‌ها بیشتر باشد میزان مقاومت آن نسبت به بیماری آتشک کمتر در نظر گرفته می‌شود و درجه‌بندی آنها را از حساس تا مقاوم مورد بررسی قرار می‌دهد از همین رو استفاده از پایه‌ها و میان پایه‌های مقاوم بصورت تجربی را برای مقاومت به بیماری مورد تأکید قرار می‌دهد (Kellerhals *et al*., Layne & Quamme, 1975 ; 2012; Şahin & Mısırlı, 2016; (Evrenosoğlu *et al*., 2019; Şahin *et al*., 2019.

مجموع قندهای ساکارز و سوربیتول

مقدار این قندها در رقم درگزی پیوندی مقاوم تا روز دوازدهم بعد از القای باکتری به‌طور جزئی کاهش یافت، میزان این قندها در رقم و پایه کوشیا/پیردوارف با شدت پیشرفت باکتری در بافت‌ها و مصرف قندها از روز ششم تا دوازدهم از۳۰ میلی‌گرم به ۲۰ میلی‌گرم کاهش یافت اما در رقم و پایه درگزی/درگزی بدلیل عدم نفوذ باکتری به گیاه بدلیل مقاومت ساختاری و بیوشیمیایی که در این رقم در برابر این بیماری دارد میزان قندها ثابت ماند. این قندها در مورد رقم و پایه کوشیا/درگزی در مقابل رقم و پایه کوشیا/پیردوارف از ابتدا بیشتر بود که با گذشت زمان از روزششم به بعد در هردو رقم و پایه‌ها کاهش یافت (شکل ۴).

در پژوهش‌های متفاوت لزوم استفاده از قندهای سوربیتول و ساکارز برای باکتری عامل آتشک در گیاهان مختلف اثبات شده است. باکتری عامل آتشک به قند نیاز دارد زیرا قندهای موجود در گیاه را مصرف و اگزوپلی‌ساکاریدی جهت تولید بیوفیلم[2](اجتماع باکتری در یک محیط) ایجاد می‌کند. باکتری آتشک در بافت گیاه هم از ساکارز و هم از سوربیتول به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند و در محیط‌کشت آگار با ۴۰ درصد ساکارز بخوبی رشد و گسترش پیدا می کند (Gross *et al*., 1992). همچنین بیماری‌زایی باکتری عامل آتشک به تولید اگزوپلی ساکارید آمیلووران بستگی دارد (Bernard *et al*., 1993; Bellemann & Geider, 1992).

1- Shoot length blighted
2- Biofilm

گیاهان خانواده رزاسه حاوی سوربیتول و ساکارز یه‌عنوان منابعی از کربوهیدرات‌های انتقالی و ذخیره‌ایی مورد استفاده در سلول هستند (Grant & Rees, 1981). باکتری عامل آتشک می‌تواند گلوکز را از ساکارز آزاد کند (Gross *et al*., 1992). توانایی متفاوت برای متابولسیم ساکارز و سوربیتول موجود در سلول‌های گیاهی برای باکتری در سلول میزبان در میزان بیماری‌زایی باکتری عامل آتشک در سیب و گلابی تأثیرگذار است، بطوری‌که باکتری با مصرف این کربوهیدرات‌ها به رشد خود در محیط داخل بافت گیاهان ادامه می دهد (Willis *et al*., 1991Barny *et al*., 1990 ;). به‌همین دلیل در بافت گیاه با نفوذ باکتری به داخل بافت‌ها مخصوصا در رقم و پایه کوشیا/درگزی و رقم و پایه کوشیا/پیردوارف با مصرف این قندها توسط باکتری با گذشت زمان میزان آن رو به کاهش گذاشته تا به ثبات برسد. اما تفاوت معنی‌داری در میزان کاهش در دو پایه مختلف با ارقام یکسان دیده می‌شود که نشان‌دهنده تأثیر پایه بر مقاومت ارقام می‌باشد.

اندازه‌گیری pH بافت گیاه

pH بافت برگ رقم کوشیای پیوند شده روی پایه پیردوارف از روز صفر تا دوازدهم ثابت نبوده بطوری‌که در روز سوم از ۶ به ۷/۲ رسید و در روزهای ششم و دوازدهم روی ۶/۲ ثابت ماند. در رقم و پایه کوشیا/درگزی نیز این روند مشاهده شد. به این ترتیب pH در روزهای ۰، ۳، ۶ و ۱۲ به‌ترتیب برابر ۵/۵، ۶/۵، ۵/۳ و ۵/۲ اندازه گیری شد. این در حالی است که در بافت برگ‌های رقم و پایه‌های درگزی/پیردوارف و درگزی/درگزی این روند تقریبا ثابت و بین ۵ تا ۵/۵ بوده است. این تفاوت در اسیدیته بافت‌ها می‌تواند ناشی از حساسیت بالاتر باشد به این دلیل که در بافت‌های حساس‌تر به باکتری با زخمی شدن و از بین رفتن سلول‌های آنها بدلیل مرگ برنامه ریزی سلول[3] که طی آن سلول‌های سالم برای جلوگیری از پیشرفت بیماری خود را نابود می‌کنند، و برای مقابله با باکتری میزان pH بافت‌ها مقداری تغییر می‌کند. ولی این تغییرات در بافت‌های حساس پیوند شده بر روی پایه مقاوم در مقایسه با بافت‌های حساس پیوند شده بر روی پایه نیمه‌حساس کمتر مشاهده شد (شکل ۵).

همه سلول‌های گیاهی پروتون‌ها را از داخل سلول و از طریق غشا به فضای بین سلولی منتقل می‌کنند. این شیب بار الکتریکی انرژی لازم را برای املاح برای ورود به سلول‌هاست (Heldt, 1997). در بیشتر گیاهان، فعالیت پمپ غشاء H+-ATPase در سیتوپلاسم pH را بین ۷/۳–۷/۶ و pH آپوپلاست را حدود ۵/۵ تنظیم

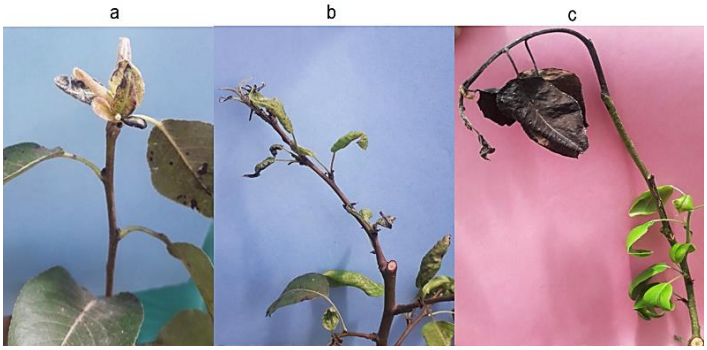
3- Apoptosis

می‌کند (Kurkdjian & Geum, 1989). با نفوذ پروتین هارپین باکتری *E. amylovora* به داخل غشا سلول باعث نشت پتاسیم به خارج سلول، پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین از کار افتادن پمپ‌های سطح غشا و قلیایی شدن محیط آن می‌شود (Brisset & Paulin, 1992). بر این اساس در سلول‌های گیاهی آلوده شده توسط *E. amylovora* نشت الکترولیت‌ها و سایر مواد آلی از داخل سلول به محیط بین سلولی و متعاقب آن تغییرات pH رخ می‌دهد که البته این تغییرات در سلول‌های غیر مقاوم و ناسازگار بیشتر است (Vanneste, 1995).

جدول ۵- شدت آلودگی ارقام پیوندی گلابی در سیستم USDA

Table 5- The contamination intensity of grafted pear cultivars in the USDA system

رقم/پایه Rootstock/Cultivar	میانگین گروه شدت آلودگی Average pollution intensity group	کد GRIN GRIN code	مفهوم گروه بر اساس کد GRIN Group concept based on GRIN code
کوشیا/پیردوارف Koshia/Pyrodwarf	2.5c	4	نیمه حساس Semi-sensitive
کوشیا/درگزی Koshia/Dargazi	8.6b	2	نیمه مقاوم Semi resistant
درگزی/پیردوارف Dargazi/Pyrodwar	9.8a	1	نسبتا مقاوم Relatively resistant
درگزی/درگزی Dargazi/Dargazi	10a	1	خیلی مقاوم Very resistant



شکل ۳- علائم اولیه و نهایی بیماری در سرشاخه‌های درخت گلابی. (a) تغییر رنگ اولیه، (b) قهوه‌ای شدن، (c) بلایت کامل

Figure 3- Initial and final symptoms of the disease in the pear tree branches. (a) initial discoloration, (b) browning, (c) complete blight

جدول ٦- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر پایه‌ها و ارقام متفاوت گلابی بر درصد بلایت در چهار مرحله زمانی پس از آلودگی

Table 6- ANOVA (mean squares) for the effect of different pear rootstock and cultivars on the blight percentage in four time stages after contamination

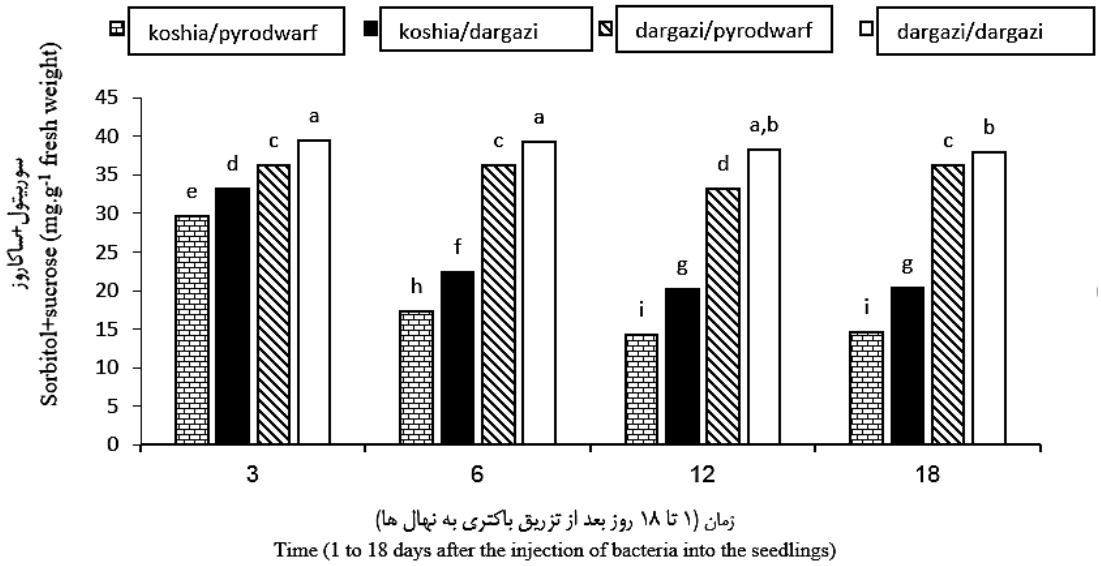
منابع تغییرات Sources of change	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square
ترکیبات پیوندی Grafted compounds	3	2642**
زمان Time	3	842**
ترکیبات پیوندی ×زمان Time× Grafted compounds	9	258**
خطا Error	32	40.62

اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۷- برهم‌کنش ترکیب‌های پیوندی گلابی در مراحل زمانی متفاوت بر درصد بلایت

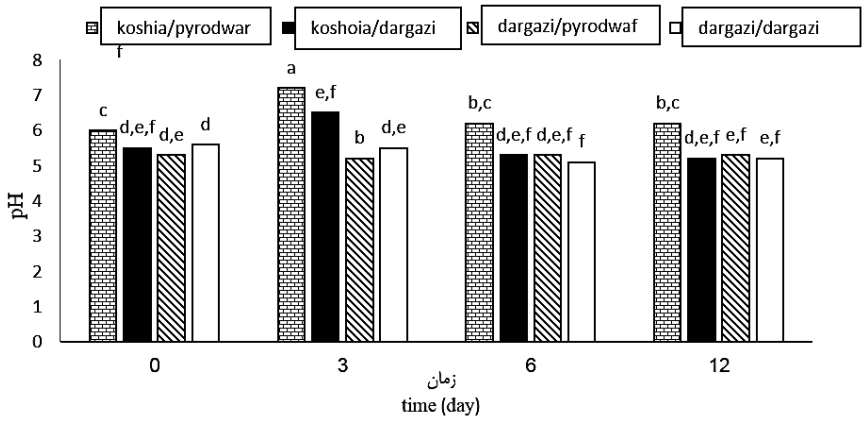
Table 7- The interaction of grafted pear combinations in different time stages on blight percentage blight

ترکیبات پیوندی Grafted compounds	روز نمونه‌برداری Sampling day			
	3	6	12	18
کوشیا/پیردوارف Koshia/Pyrodwarf	10 cd	20 bc	50 a	50 a
کوشیا/درگزی Koshia/Dardazi	10 cd	25 b	30 b	30 b
درگزی/پیردوارف Dargazi/Pyrodwarf	0 d	10 cd	10cd	10 cd
درگزی/درگزی Dargazi/Dargazi	0 d	0 d	0 d	0 d



شکل ٤- مجموع قندهای ساکارز + سوربیتول ترکیب‌های مختلف پیوندی گلابی طی زمان

Figure 4-Total sugars of sucrose + sorbitol of different pear grafted combinations over time



شکل ٥- تغییرات pH بافت‌های برگ ترکیب‌های مختلف پیوندی گلابی نسبت به زمان

Figure 5- pH changes of leaf tissues of different pear grafting combinations over time

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بین ترکیب‌های پیوندی مطالعه شده درجات مختلفی از مقاومت به بیماری آتشک وجود دارد که بیانگر وجود پتانسیل کافی برای برنامه به‌نژادی و به‌زراعی گلابی جهت مقاومت به این بیماری است. رقم درگزی هم در شرایط باغی و هم گلخانه‌ایی درجه بسیار بالایی از مقاومت را نسبت به بیماری آتشک دارد. به‌طور کلی پایه مقاوم درگزی تا حدودی اثر مقاومت خود را بر روی رقم کوشیا حساس می‌گذارد به‌طوری‌که میزان مقاومت ترکیب پیوندی کوشیا/درگزی بیشتر از میزان مقاومت ترکیب پیوندی کوشیا/پیردوارف است. البته ذکر این نکته ضروری است که تکرار این آزمایشات در طی سالیان مختلف با رطوبت متفاوت که عامل اصلی همه‌گیری بیماری است باعث بدست آمدن نتایج دقیق‌تر اثر پایه بر میزان مقاومت پیوندک به بیماری آتشک است. این مقاومت به‌صورت بیوشیمیایی در بافت نهال اعمال می‌شود. اما چیزی که در این آزمایش پر واضح است اثر مستقیم پایه مقاوم بر مقاومت رقم به بیماری آتشک است. رقم درگزی اغلب در شمال‌شرق کشور کشت می‌گردد، اما از نظر کیفیت میوه مطلوبیت زیادی ندارد و عمدتا از بذر آن جهت تولید پایه بذری برای سایر ارقام گلابی استفاده می‌شود. همچنین در برنامه‌های به‌نژادی و به‌زراعی گلابی، رقم درگزی می تواند به‌عنوان یک والد برای انتقال ژن مقاومت به بیماری مورد استفاده قرار بگیرد.

References

1. Abdollahi, H., Rugini, E., Ruzzi, M., & Muleo, R. (2004). *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *79*(2), 203-212. https://doi.org/10.1007/s11240-004-0661-0
2. Aldridge, P., Metzger, M., & Geider, K. (1997). Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Molecular Genetics and Genomics*, *256*, 611–619. https://doi.org/10.1007/s004380050609
3. Aleksandrova, D., & Dimitrova, N. (2021). *The reaction of pear cultivars grafted on pear and quince rootstocks after artificial inoculation of Erwinia amylovora*. In IV International Symposium on Horticulture in Europe-SHE2021 1327 (pp. 321-328). https://doi.org/10.17660/actahortic.2021.1327.43
4. Ark, P.A. (1973). Variability in the fire blight organism *Erwiniya amylovora*. *Phytopathology*, *27*, 1-28.
5. Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., & Nasiri, J. (2017). ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). *European Journal of Plant Pathology*, *147*(2), 279-294. https://doi.org/10.1007/s10658-016-1000-0
6. Barny, M. A., Guinebretiere, M.H., Marcais, B., Coissac, E., Paulin, J.P., & Laurent, J. (1990). Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Molecular Microbiology*, *4*, 777–786. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00648.x
7. Bellemann, P., Bereswill, S., Berger, S., & Geider, K. (1994). Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *16*, 290–296. https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90058-2
8. Bellemann, P., & Geider, K. (1992). Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *The Journal of General Microbiology*, *138*, 931–940. https://doi.org/10.1099/00221287-138-5-931
9. Bernhard, F., Coplin, D.L,. & Geider, K. (1993). A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to cps genes in *Erwinia stewartii*. *Molecular Genetics and Genomics*, *239*, 158–168. https://doi.org/10.1007/bf00281614
10. Billing, E. (1974). The effect of temperature on the fire blight pathogene, *Erwiniya amylovora*. *Journal of Applied Bacteriology*, *37*, 643-648.
11. Billing, E., Baker, L., A.E., Cross, J.E., & Garret, C.M.E. (1961). Characteristics of English isolation of *Erwiniya amylovora*. *Journal of Applied Bacteriology*, *24*, 195-211.
12. Brisset, N.M., & Paulin, J.P. (1992). A reliable strategy for the study of disease and hypersensitive reaction induced by *Erwinia amylovora*. *Plant Science*, *85*, 171–177. https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90113-z
13. Choi, H.J., Kim, Y.J., Lim, Y.J., & Park, D.H. (2019). Survival of *Erwinia amylovora* on surfaces of materials used in orchards. *Research in Plant Disease*, *25*(2), 89-93. https://doi.org/10.5423/rpd.2019.25.2.89
14. Dagher, F., Olishevska, S., Philion, V., Zheng, J., & Déziel, E. (2020). Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*, *6*(10), e05222. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05222

15. Doolotkeldieva, T., & Bobusheva, S. (2016). Fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae plants in Kyrgyzstan and biological agents to control this disease. *Advances in Microbiology, 6*(11), 831. https://doi.org/10.4236/aim.2016.611080
16. Evrenosoğlu, Y., Mertoğlu, K., Bilgin, N.A., Misirli, A., & Özsoy, A.N. (2019). Inheritance pattern of fire blight resistance in pear. *Scientia Horticulturae, 246*, 887–892. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.069
17. Grant, C.R., & Rees, T. (1981). Sorbitol metabolism by apple seedlings. *Phytochemistry, 20*, 1505–1511. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)98521-2
18. Gross, M., Geier, G., Rudolph, K., & Geider, K. (1992). Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiol. *Molecular Plant Pathology, 40*, 371–381. https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90029-u
19. Jakab-Ilyefalvi, Z., Platon, I., & Festila, A. (2012). Fire blight susceptibility of some pear varieties (*Erwinia amylovora*, Burill). *Fruit Growing Research*, 28.
20. Heldt, H.W. (1997). *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, New York.
21. Kellerhals, M., Szalatnay, D., Hunziker, K., Duffy, B., Nybom, H., Ahmadi-Afzadi, M., Höfer, M., Richter, K., & Lateur, M. (2012). European pome fruit genetic resources evaluated for disease resistance. *Trees, 26*(1), 179–189. https://doi.org/10.1007/s00468-011-0660-9
22. Korba, J., Šillerová, J., & Kůdela, V. (2008). Resistance of apple varieties and selections to *Erwinia amylovora* in the Czech Republic. *Plant Protection Science, 44*(3), 91-96. https://doi.org/10.17221/19/2008-pps
23. Khan, M.A., Zhao, Y.F., & Korban, S.S. (2012). Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter, 30*(2), 247-260. https://doi.org/10.1007/s11105-011-0334-1
24. Layne, R.E.C., & Quamme, H.A. (1975). Pears. In J. Janick & J. N. Moore (Eds.), *Advances in fruit breeding* (pp. 38–70). Purdue University Press, West Lafayette.
25. Kurdjian, A., & Guem, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. Ann. Rev. Plant Physiol. *Plant Molecular Biology, 40*, 271–303. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001415
26. Mikiciński, A., Puławska, J., Molzhigitova, A., & Sobiczewski, P. (2020). Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology, 156*(1), 257-272. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1948157/v1
27. Millier, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry, 31*(3), 426-428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030
28. Risteveski, B.P., & Risteveska, A.B. (1996). Resistance of pear varietties to fire blight in the Ripoblic of Macedonia. *Acta Horticulturae, 311*, 256-259. https://doi.org/10.17660/actahortic.1996.411.79
29. Şahin, M., & Mısırlı, A. (2016). Ülkemizde ve dünyada ayva ıslahı çalışmaları. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 286–294. https://doi.org/10.17100/nevbiltek.211008
30. Şahin, M., Mısırlı, A., & Özaktan, H. (2019). Ege ve Doğu Marmara Bölgesi ayva plantasyonlarında ateş yanıklığı hastalığının değerlendirilmesi. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 29*(1), 1-14. https://doi.org/10.18615/anadolu.568756
31. Şahin, M., Mısırlı, A., & Özaktan, H. (2020). Determination of fire blight (*Erwinia amylovora*) susceptibility in Turkey's *Cydonia oblonga* Mill. Germplasm. *European Journal of Plant Pathology, 157*(2), 227-237. https://doi.org/10.1007/s10658-020-01971-5
32. Salcedo, F., & Matta, B. (2000). Inflluence of nitrogen and calcium fertilizier on fire blight suceptibility of royal Gala apple tree. *Mississipi Agricultural and Experiment Station Research Rep, 21*, 1-6.
33. Seidghasemi, A. (2014). Occurrence of fire blight caused by *Erwinia amylovora* on quince in Kerman Province.
34. Shrestha, R., Lee, S.H., Hur, J.H., & Lim, C.K. (2005). The effects of temperature, ph, and bactericides on the growth of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology, 21*, 127–131. https://doi.org/10.5423/ppj.2005.21.2.127
35. Stošić, S., Ristić, D., Savković, Ž., Grbić, M.L., Vukojević, J., & Živković, S. (2021). *Penicillium* and *Talaromyces* species as postharvest pathogens of pear fruit (*Pyrus communis*) in Serbia. *Plant Disease, 105*(11), 3510-3521. https://doi.org/10.1094/pdis-01-21-0037-re
36. Tomas, T.M., & Jones, A.L. (1992). Severity of fire blight on apple cultivars an strains in Michigan. *Plant Disease, 76*, 1049-1052. https://doi.org/10.1094/pd-76-1049
37. Vander Zevit, T.W., Oitto, A., & Brooks, H.J. (1970). Scoring system for rating the severity of fire blight in pear. *Plant Disease, 54*, 835-839.
38. Vanneste, J.L. (1995). *Erwinia amylovora*. In: Singh US, Singh RP & Kohmoto K (eds) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Vol. 1. (pp. 21–46).
39. VanderZevit, T., & Keli, H.L. (1979). *Fire blight , A Bacterial Disease of Rosaceous Plants*. Agric. Handbook, No. 510, U. S. Government printing office, washington D. C.

40. Venisse, J.S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J.P., & Brisset, M.N. (2002). Modulation of defence responses of Malus during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, *15*, 1204-1212. https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.12.1204
41. Willis, D.K., Rich, J.J., & Hrabak, E.M. (1991). hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *4*, 132–138. https://doi.org/10.1094/mpmi-4-132

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 537-549

The Study of Drought Resistance in Different Ecotypes of Garlic Based on the Tolerance Indices in the Climatic Conditions of Hamedan

M. Kakaei[1*]
1- Associate Professor of Plant Breeding, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: m.kakaei@pnu.ac.ir)

Received: 16-11-2023
Revised: 05-02-2024
Accepted: 23-04-2024
Available Online: 24-04-2024

How to cite this article:
Kakaei, M. (2024). The study of drought resistance in different ecotypes of garlic based on the tolerance indices in the climatic conditions of Hamedan. *Journal of Horticultural Science, 38*(3), 537-549. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85395.1303

Introduction and Objective

The garlic (*Allium sativum*) is a plant that is known all over the world as a food additive or flavoring and also because of its medicinal properties. Garlic is chemically diverse, and many compounds have been extracted and tested from it, including Allicin, diallyl sulfides, and ajoene, which are probably the most studied compounds in garlic. Garlic has antibacterial activity, cardiovascular effect, stimulation of the immune system and also has an effect on cancer. Therefore, given the statistics on rainfall and the excessive extraction pressure on underground water sources, large-scale research on drought in agriculture is essential. Drought is a significant limiting factor in agricultural production, preventing maximum plant yield. Thus, comparing performance in various environmental conditions (stressed and non-stressed) and selecting cultivars under such conditions can help evaluate their resistance to stress. Drought and water limitation are among the most important problems affecting the agricultural sector to increase the efficiency and optimal production of crops in the world, including Iran. Successful crossing of land requires research and applied research in this sector. But few studies have been performed in connection with garlic medicinal plant. Therefore, the present study was designed and implemented with the aim of investigating yeild indicators in two environmental conditions (environment with supplemental irrigation and dry environment) in garlic plant with the help of drought tolerance indicators.

Materials and Methods

In this research, in order to investigate the genetic diversity of garlic ecotypes, sieve and to identify resistant ecotypes in dry land, 6 garlic ecotypes with the arrangement of randomized complete blocks design with three replications in the crop year 2023 in two stress environmental conditions drought and without drought stress was designed and implemented in the educational-research farm of Payame Noor University in Asadabad. The studied drought tolerance indices are: yield index (YI), stress tolerance index (STI), harmonic mean index (HAM), average productivity index (MP), yield stability index (YSI), sensitivity index to stress (SSI) and tolerance index (TOL) were based on the economic yield of garlic in two environmental conditions of drought stress and without drought stress. Correlation was calculated between tolerance indices and yield under drought stress conditions and supplementary irrigation conditions, and based on the analysis of these correlations, tolerance indices were selected and the most appropriate indices were selected in both environmental conditions, including drought stress conditions and supplementary irrigation that had a good correlation with yield were selected. Finally, after identifying the most favorable indicators, a three-dimensional statistical graph was used to determine drought-tolerant cultivars with high yield in both environmental conditions, in which the yield in supplementary irrigation conditions on the X-axis, the yield in stress conditions (rain) was shown on the Z-axis and one of the above-mentioned selected indicators on the Y-axis. To show the relationship between three variables and distinguish group A from other groups (B, C and D) as well as the usefulness of the mentioned index as a criterion for selecting cultivars with high yield and tolerance to

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85395.1303

drought, X-Z level by drawing cross lines to four groups A, B, C and D were divided and because in a three-dimensional diagram only the relationship between three variables can be evaluated, to study more than three variables at the same time, bi-plot diagrammatic display based on analyzes Multi-variables were drawn with the help of the digit-index data matrix to determine the relationships between digits and drought tolerance indices in a single image. Before performing data analysis, the presence of outliers was checked. Statistical analysis of the data was done using Minitab version 15 and SPSS version 26.

Results and Discussion

Based on the results of analysis of variance, the yield index in normal humidity conditions and the yield index in drought stress conditions were significant at the probability level of one percent (P≤1%). In this study, STI, SSI, MP, GMP, HAM, YI, YSI, DI and STS indicators were significant at the probability level of one percent (P≤1%), which indicates the diversity among ecotypes. garlic in terms of the studied indicators. Based on the decomposition into main components for drought tolerance indices, both the first and second components justify 94% of the changes. According to the correlation table, the correlation between yield in normal humidity conditions (Yp) with yield traits in drought stress conditions (Ys) and MP, GMP, HAM, YI, ATI, YSI and STS indicators has a positive and significant correlation. be in the bi-plot diagram, ecotypes Bahar2 and Soolan are located near STI, ATI, GMP and MP indicators, which are indicators of drought tolerance. These two ecotypes (Bahar2 and Soolan) are also located in they were placed in the first group, so it can be concluded that according to the biplot diagram, these ecotypes were desirable and indicative ecotypes. Based on cluster analysis, ecotypes are classified into two statistical groups, the first group includes ecotypes Maryanaj, Bahar1 and Emam zadeh koh (Toeejin), and the second group includes ecotypes Bahar2 and Soolan and Asadabad. Ecotypes with lower yield are placed in the first group and ecotypes with higher and more suitable yield are placed in the second group.

Conclusion

Based on all the statistical analyses used in the research, the Bahar2 and Soolan ecotypes had the highest biomass yield. The overall results of this research indicated the very important and useful role of drought tolerance indices in differentiating the studied ecotypes.

Keywords: Bi-plot, Drought tolerance indicators, Supplementary irrigation, Yield

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۳۷-۵۴۹

مطالعه مقاومت به خشکی در اکوتیپ‌های مختلف سیر بر اساس شاخص‌های تحمل در شرایط آب‌وهوایی همدان

مهدی کاکایی[1*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۴

چکیده

خشکی و محدودیت آب از جمله مهمترین مسائل مرتبط با بخش کشاورزی برای افزایش راندمان و تولید مطلوب محصولات زراعی و باغی در دنیا و از جمله ایران می‌باشد. عبور موفق از خشکی مستلزم تحقیقات و پژوهش‌های کاربردی در این بخش می‌باشد. در این پژوهش برای بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سیر، غربال و شناسایی اکوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی، تعداد شش اکوتیپ سیر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۴۰۲-۱۴۰۱ در دو شرایط محیطی تحت تنش خشکی و بدون تنش خشکی طراحی و اجرا گردید. شاخص‌های تحمل به خشکی مورد بررسی عبارت بودند از: شاخص عملکرد (YI)، شاخص تحمل تنش (STI)، شاخص میانگین هارمونیک (HAM)، شاخص بهره‌وری متوسط (MP)، شاخص پایداری عملکرد (YSI)، شاخص حساسیت به تنش (SSI) و شاخص تحمل (TOL) که بر اساس عملکرد اقتصادی سیر در دو شرایط محیطی فوق‌الذکر اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج حاصله از تجزیه واریانس، شاخص عملکرد در شرایط بدون تنش خشکی و شاخص عملکرد در شرایط تنش خشکی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. در این مطالعه، شاخص‌های STI، SSI، MP، GMP، HAM، YI، YSI، DI و STS در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند که نشان‌دهنده تنوع موجود در بین اکوتیپ‌های سیر از نظر شاخص‌های مورد مطالعه می‌باشد. بر اساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای شاخص‌های تحمل به خشکی، مجموع دو مؤلفه اول و دوم ۹۴ درصد از تغییرات ایجاد شده را توجیه نمودند. همبستگی بین عملکرد در شرایط بدون تنش خشکی (Yp) با صفات عملکرد در شرایط تنش خشکی (Ys) و شاخص‌های MP، GMP، HAM، YI، ATI، YSI و STS همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان داد. در نمودار بای‌پلات اکوتیپ‌های 'بهار ۲' و 'سولان' در جوار شاخص‌های STI، ATI، GMP و MP که شاخص‌های تحمل به خشکی می‌باشند قرار گرفتند و این دو اکوتیپ ('بهار ۲' و 'سولان') بر اساس نمودار سه بعدی نیز در گروه اول قرار گرفتند. لذا بر اساس نمودار بای‌پلات نیز این اکوتیپ‌ها، اکوتیپ‌های مطلوب و شاخصی بوده‌اند. بر اساس تجزیه خوشه ای اکوتیپ‌ها به دو گروه دسته‌بندی شدند، گروه اول شامل اکوتیپ‌های 'مریانج'، 'بهار ۱' و 'امامزاده‌کوه' (توئیجین) و گروه دوم شامل اکوتیپ‌های 'بهار ۲'، 'سولان' و 'اسدآباد' بودند. در گروه اول اکوتیپ‌هایی با عملکرد کمتر و در گروه دوم اکوتیپ‌هایی با عملکرد بالاتر و مناسب‌تر قرار گرفتند. به‌طور کلی و بر اساس کلیه تجزیه‌های آماری مورد استفاده در پژوهش حاضر به‌ترتیب اکوتیپ‌های 'بهار ۲' و 'سولان' بیشترین عملکرد زیست‌توده را به خود اختصاص دادند.

واژه‌های کلیدی: آبیاری تکمیلی، بای‌پلات، شاخص‌های تحمل خشکی، عملکرد

مقدمه

گیاه سیر *Allium sativum* L. گیاهی است که در سراسر جهان به‌عنوان یک افزودنی غذایی یا طعم‌دهنده و همچنین به‌دلیل فراوانی خواص دارویی آن، شناخته شده است. سیر از نظر ترکیبات شیمیایی متنوع می‌باشد و ترکیبات زیادی از آن شامل آلیسین، دی‌آلیل سولفیدها و آجوئن که احتمالاً بیشترین و مطالعه‌شده‌ترین ترکیبات سیر هستند استخراج و آزمایش شده است. از جمله خواص بالینی سیر، فعالیت ضدباکتریایی، اثر قلبی عروقی، محرک سیستم ایمنی و همچنین اثر ضد سرطانی آن می‌باشد (Oosthuizen *et al.*, 2018). خشکسالی یک اتفاق طبیعی می‌باشد و اجتناب از آن غیرممکن است. خشکی و خشکسالی در مقیاس جهانی، مقیاس محلی و منطقه‌ای

۱- دانشیار اصلاح‌نباتات، بخش علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: m.kakaei@pnu.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85395.1303

مصداق و تعاریف مربوط به خود را دارد. بنابراین خشکسالی یک خصوصیت طبیعی و نرمال از اقلیم است که در کلیه رژیم‌های جغرافیایی قابل اتفاق است (Wilhite, 1993; Khalili, 2016). لذا با توجه به آمار نزولات آسمانی و فشار مضاعف به منابع آبی زیرزمینی (اضافه برداشت) تحقیقات مربوط به خشکی در کشاورزی در سطح وسیع باید انجام بگیرد. خشکی از جمله عوامل مهم محدود کننده تولیدات زراعی به شمار می‌رود که از پتانسیل تولید گیاهان می‌کاهد. لذا قیاس عملکرد در شرایط محیطی متنوع (تنش خشکی و بدون تنش خشکی) و انتخاب در چنین شرایطی، رقم مطلوب و دارای عملکرد بالاتر در دو محیط را شناسایی می‌کند (Kakaei *et al.*, 2010). بر مبنای فرمول (Fernandez, 1992) ارقام مورد مطالعه از نظر توان عملکردی و تحمل به تنش به چهار بخش شامل: گروه A (ارقام یا ژنوتیپ‌هایی که در هر دو شرایط تنش و بدون تنش دارای عملکرد نسبی بالاتری هستند)، B (ارقامی که تنها در شرایط محیطی فاقد تنش، دارای عملکرد بالایی هستند)، C (ارقامی که در شرایط تنش دارای عملکرد نسبی بالایی هستند) و D (ارقامی که در دو محیط دارای شرایط تنش و بدون تنش دارای عملکرد پایین‌تری هستند) قابل تفکیک هستند. در پژوهشی در سال ۱۹۹۲ اعلام شد که هر شاخصی که بتواند ارقام گروه A را از سایر گروه‌ها تشخیص دهد، می‌توان آن را شاخص مناسبی در نظر گرفت (Fernandez, 1992). در تحقیقی، شاخص تحمل به تنش (STI) برای شناسایی ارقام گروه A ارائه شد و اعلام گردید که مقدار عددی بالای این شاخص برای هر رقم، نشان‌دهنده تحمل به خشکی بالاتر و عملکرد فوق‌العاده بالاتر آن رقم می‌باشد (Fernandez, 1992). در پژوهشی در سال ۲۰۱۰ اعلام شد که شاخص STI مطلوب‌ترین شاخص جهت انتخاب ارقام متحمل می‌باشد (Kakaei *et al.*, 2010). فرناندز (Fernandez, 1992) شاخص دیگری به نام شاخص میانگین هندسی عملکرد (محصول‌دهی) به نام (GMP) را معرفی نمود. این شاخص نیز در تفکیک ارقام، شاخص مطلوبی است. شاخص SSI که برای اولین بار فیشر و مائورر (Fischer & Maurer, 1978) آن را معرفی کردند و آنها اعلام کردند که ارقام با میزان عددی کمتر SSI، نشان‌دهنده تغییرات کم عملکرد در محیط تنش نسبت به محیط بدون تنش و پایداری بیشتر رقم می‌باشد. لذا گزینش بر مبنای SSI باعث انتخاب ارقام متحمل به تنش ولیکن با پتانسیل عملکرد کم‌تر می‌شود. شاخص YSI را بوسلاما و اسچاپو (Bouslama & Schapaugh, 1984) معرفی کرد. عملکرد در محیط تنش و بدون تنش در این شاخص با هم ارتباط دارند لذا از ژنوتیپی با میزان شاخص YSI بالاتر انتظار است که در هر دو محیط، عملکرد بیشتری داشته باشند. شاخص‌های تحمل (TOL) و میانگین بهره‌وری (MP) به‌وسیله روسیل و هامبلین (Rosielle & Hamblin, 1981) اعلام شد. لذا ایشان اعتقاد داشتند که گزینش بر اساس میزان کمتر شاخص تحمل (TOL)، سبب انتخاب ارقامی خواهد شد که عملکرد آنها در شرایط تنش نسبت به شرایط غیر تنش، کاهش کمتری داشته و از ثبات عملکرد مناسبی برخوردار خواهد بود. بنابراین گزینش بر اساس شاخص میانگین محصول‌دهی (MP) باعث گزینش ارقامی با پتانسیل عملکرد بالا ولیکن تحمل کم به تنش می‌گردد. محققین بسیاری از شاخص‌های تحمل خشکی در مطالعات خود استفاده کرده‌اند و آنها را روش‌های مطلوبی جهت شناسایی ژنوتیپ‌های دارای عملکرد مناسب در هر دو شرایط محیطی دانسته‌اند (Kakaei Kakaei *et al.*, 2010; Kakaei *et al.*, 2012; Kakaei; 2019). نظر به ضرورت ارزیابی تنش خشکی در حوزه کشاورزی و مهم بودن کشت گیاهان دارویی و صنعتی، اجرای تحقیق در ارتباط با بررسی تنش خشکی بر خصوصیات رشدی این نوع گیاهان، ضروری می‌باشد. لیکن پژوهش‌های اندکی در رابطه با گیاه دارویی سیر صورت گرفته است. لذا مطالعه پیش‌رو با هدف بررسی شاخص‌های عملکردی در دو شرایط محیطی (شرایط با آبیاری تکمیلی و شرایط دیم) در گیاه سیر با کمک شاخص‌های تحمل خشکی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از شش اکوتیپ محلی سیر بومی در غرب کشور (منطقه همدان) استفاده گردید (جدول ۱). اکوتیپ‌های این تحقیق در تاریخ سی‌ام آبان ماه ۱۴۰۱ در مزرعه آموزشی-پژوهشی دانشگاه پیام‌نور اسدآباد مورد کاشت واقع گردید. عمل تهیه زمین با استفاده از گاوآهن برگرداندار صورت پذیرفت و بعد از آماده کردن زمین، کاشت سیرچه‌ها به‌وسیله دست انجام گرفت. فاصله بین بوته‌ها در هر ردیف ۱۵ سانتی‌متر و فاصله بین ردیف‌ها نیز ۲۰ سانتی‌متر برای هر کرت در نظر گرفته شد. اقدامات زمان داشت گیاه، شامل مبارزه با علف‌های هرز توسط دست انجام شد. در فواصل زمانی کاشت تا زمان برداشت هیچ‌گونه آبیاری در سایت دیم صورت نپذیرفت ولیکن یک نوبت آبیاری تکمیلی (در تکمیل بارندگی‌های انجام شده) در مرحله ۶ تا ۸ برگی در سایت با آبیاری تکمیلی انجام شد. در زمان عملیات کاشت گیاه، از کود دامی پوسیده به میزان دو تن در هکتار در زمین استفاده شد. سیرچه‌های اکوتیپ‌های سیر مورد مطالعه در این تحقیق از کشاورزان و بازارچه‌های محلی استان همدان تهیه شد و به نام شهر و منطقه مورد جمع‌آوری نامگذاری گردیدند. شکل ۱، تصویر سیرچه‌های (برداشت شده) اکوتیپ‌های سیر مورد پژوهش را نشان می‌دهد. بوته‌ها بعد از ۱۹۰ روز از کشت سیرچه‌ها، به‌صورت دستی برداشت شدند. با رعایت حذف اثر حاشیه و در پایان مرحله‌ی رشدی یعنی

بعداز رسیدگی کامل گیاه، از صفت زیست‌توده (وزن تک بوته با اندام هوایی) مربوط به هر واحد آزمایشی (اکوتیپ) به‌طور تصادفی انتخاب شد و اندازه‌گیری‌های مربوط به وزن با ترازوی دیجیتال حساس از نوع Jadever (Sky)، در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه پیام نور اسدآباد انجام گرفت. شاخص‌های حساسیت و تحمل خشکی با استفاده از روابط جدول ۲ (شاخص حساسیت به تنش (Fischer & Maurer, 1978)، شاخص تحمل (Rosielle & Hamblin, 1981)، شاخص میانگین بهره‌وری (Rosielle & Hamblin, 1981)، شاخص تحمل تنش (Fernandez, 1992)، شاخص میانگین هندسی بهره‌وری (Fernandez, 1992)، شاخص میانگین هارمونیک (Fernandez, 1992)، شاخص عملکرد (Lin *et al*., 1986)، شاخص تحمل به تنش تغییر یافته در شرایط تنش و بدون تنش (Farshadfar & Sutka, 2002)، شاخص حساسیت به خشکی (Farshadfar & Sutka, 2002)، شاخص تحمل تنش غیر زنده (Moosavi *et al*., 2008)، شاخص پایداری عملکرد (Blum, 1988) و شاخص امتیازدهی تحمل خشکی (Farshadfar & Sutka, 2002) محاسبه شدند (جدول ۳). بین شاخص‌های تحمل و عملکرد در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی همبستگی محاسبه شد و بر مبنای تحلیل این همبستگی‌ها، شاخص‌های تحمل گزینش شدند و مناسب‌ترین شاخصی که در هر دو شرایط محیطی شامل شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی که دارای همبستگی مناسبی با عملکرد بودند گزینش شدند. نهایتاً بعد از تشخیص مطلوب‌ترین شاخص(ها)، برای تعیین ارقام متحمل به خشکی با عملکرد بالا در هر دو شرایط محیطی از گراف آماری سه بعدی استفاده شد که در آن عملکرد در شرایط آبیاری تکمیلی بر روی محور Xها، عملکرد در شرایط تنش (دیم) بر روی محورZها و یکی از شاخص‌های گزینش شده فوق‌الذکر بر روی محور Yها نشان داده شد (Kakaei, 2019b). برای نمایش ارتباط بین سه متغیر و تمیز نمودن گروه A از سایر گروه‌ها (B، C و D) و نیز سودمندی شاخص مورد اشاره به عنوان معیاری برای گزینش ارقام با عملکرد بالا و متحمل به خشکی، سطح X-Z با رسم خطوط متقاطع به چهار گروه A، B، C و D تقسیم گردید و به‌دلیل اینکه در یک نمودار سه‌بعدی تنها ارتباط بین سه متغیر را می‌توان ارزیابی کرد. برای مطالعه همزمان بیشتر از سه متغیر، نمایش ترسیمی بای‌پلات بر اساس تجزیه‌های چندمتغیره، با کمک ماتریس داده‌های رقم-شاخص برای تعیین روابط بین ارقام و شاخص‌های تحمل به خشکی در یک تصویر واحد رسم شد (Kakaei, 2023). قبل از انجام تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، وجود داده‌های پرت مورد بررسی قرار گرفت (Kakaei, 2023). برای تجزیه‌وتحلیل‌های آماری داده‌ها از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۵ و SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد و از روش چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین در سطح احتمال ۱ درصد استفاده گردید. جدول ۳ مجموع بارش‌ها در زمان کاشت و پس از آن به‌صورت ماهانه و بر حسب میلی‌متر در شرایط محل پژوهش را نشان می‌دهد.

نتایج و بحث

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، اختلاف شاخص عملکرد در شرایط بدون تنش خشکی و شاخص عملکرد در شرایط تنش خشکی در سطح احتمال یک درصد ($P\leq0.01$) معنی‌دار گردید. در این مطالعه، شاخص‌های STI، SSI، MP، GMP، HAM، YI، YSI، DI و STS در سطح احتمال یک درصد ($P\leq0.01$) معنی‌دار شدند که نشان‌دهنده تنوع موجود در بین اکوتیپ‌های سیر از نظر شاخص‌های مورد مطالعه می‌باشد. در حقیقت این نتیجه نشان‌دهنده شرایط مناسب و متنوع بین عملکرد در شرایط بدون تنش خشکی و شرایط تنش خشکی می‌باشد که به‌نژادگر قادر به انتخاب از بین تنوع شناسایی شده می‌باشد. محققین بسیاری در پژوهش‌های خود از تجزیه واریانس شاخص‌های تحمل به خشکی استفاده کرده و شاخص های معنی‌داری که در این تحقیق معنی‌دار بوده‌اند را نیز گزارش نموده‌اند (Kakaei *et al*., 2010، Kakaei *et al*., 2019a، Kakaei *et al*., 2019b).

جدول ۱- اسامی اکوتیپ‌های مختلف مورد مطالعه گیاه سیر

Table 1- Different ecotypes of studied garlic plants

ردیف Row	نام اکوتیپ Ecotype name	ردیف Row	نام اکوتیپ Ecotype name
1	مریانج Maryanaj	4	سولان Soolan
2	بهار ۲ Bahar 2	5	اسدآباد Asadabad
3	بهار ۱ Bahar 1	6	امامزاده کوه (توئیجین) Emam zadeh koh (Toeejin)

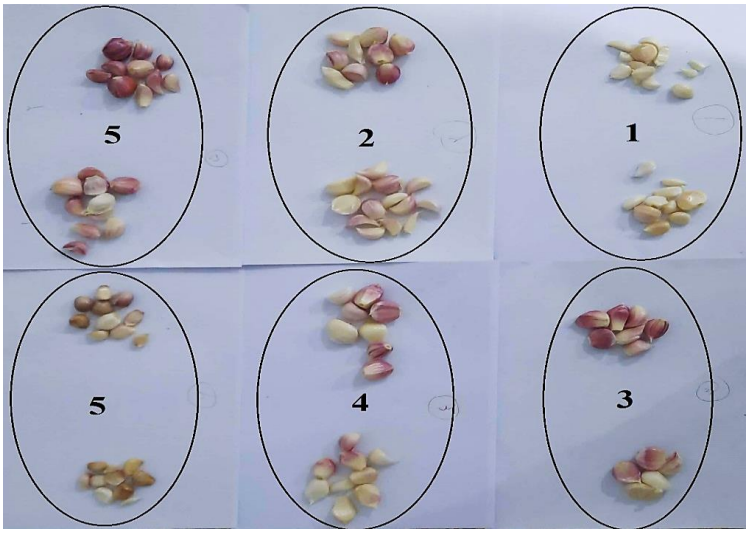
جدول ۲- شاخص‌های متحمل به خشکی مورد مطالعه در اکوتیپ های مختلف گیاه سیر

Table 2- Drought tolerant indicators for studied ecotypes of garlic plants

(1)	شاخص حساسیت به تنش Stress Susceptibility Index (SSI)	$SSI = \frac{1-(Y_S/Y_P)}{1-(\bar{Y}_S/\bar{Y}_P)}$
(2)	شاخص تحمل Stress Tolerance (TOL)	$TOL = Y_P - Y_S$
(3)	شاخص میانگین بهره‌وری Mean Productivity (MP)	$MP = \frac{Y_S + Y_P}{2}$
(4)	شاخص تحمل تنش Stress Tolerance Index (STI)	$STI = \frac{Y_S \times Y_P}{\bar{Y}_P^2}$
(5)	شاخص میانگین هندسی بهره‌وری Geometric Mean Productivity (GMP)	$GMP = \sqrt{(Y_S \times Y_P)}$
(6)	شاخص میانگین هارمونیک Harmonic Index	$HMP = \frac{2\,Y_P \times Y_S}{Y_P + Y_S}$
(7)	شاخص عملکرد Yield Index (YI)	$YI = \frac{Y_S}{\bar{Y}_S}$
(8)	شاخص تحمل به تنش تغییر یافته تحت شرایط بدون تنش Modified Stress Tolerance Index in Without Drought Stress	$K_1STI = \frac{(Y_P)^2}{(\bar{Y}_P)^2} \times STI$
(9)	شاخص تحمل به تنش تغییر یافته تحت شرایط تنش Modified Stress Tolerance Index in Drought Stress	$K_2STI = \frac{(Y)^2}{(\bar{Y}_S)^2} \times STI$
(10)	شاخص حساسیت به خشکی Drought Resistance Index	$DI = Y_S \times \left(\frac{(\frac{Y_S}{Y_P})}{\bar{Y}_S} \right)$
(11)	شاخص تحمل تنش غیرزنده (Abiotic-stress Tolerance Index (ATI))	$ATI = (\frac{Y_P - Y_S}{\frac{\bar{Y}_S}{\bar{Y}_P}}) \times GMP$
(12)	شاخص پایداری عملکرد Yield Stability Index (YSI)	$YSI = \frac{Y_S}{Y_P}$
(13)	شاخص امتیازدهی تحمل خشکی (Stress Tolerance Score (STS))	STS=GMPstd+STIstd+HMPstd+MPstd-TOLstd–SSIstd-bstd

Yp و Ys به‌ترتیب عملکرد دانه در شرایط بدون تنش خشکی و دارای تنش خشکی و $\bar{Y}_p$ و $\bar{Y}_s$ به‌ترتیب میانگین‌های عملکرد در شرایط بدون تنش خشکی و دارای تنش خشکی می‌باشند.

Yp and Ys are the grain yield in the conditions without drought stress and with drought stress, respectively, and Yp and Ys are the average yield in the conditions without drought stress and with drought stress, respectively.



شکل ۱- تصویر سیرچه‌های، اکوتیپ‌های مختلف مورد مطالعه گیاه سیر

Figure 1- The cloves of different studies ecotypes of garlic plants

جدول ۳- مقدار بارندگی ماهانه (بر حسب میلی‌متر) در محل انجام پژوهش

Table 3- The amount of monthly rainfall (in mm) in the research location

سال زراعی Year	اسفند ۱۴۰۱ 2023 February	فروردین ۱۴۰۲ 2023 March	اردیبهشت ۱۴۰۲ 2023 April	خرداد ۱۴۰۲ 2023 May	تیر ۱۴۰۲ 2023 June
1401-1402 2022-2023	43.3	55.7	61.2	28.9	0

در جدول ۵، عملکرد سوخ در دو شرایط رطوبتی و میزان عددی دیگر شاخص‌های تحمل خشکی و ضریب تغییرات مربوطه نشان داده شده است. در خصوص عملکرد در شرایط بدون تنش خشکی (Yp) و عملکرد سوخ در شرایط تنش خشکی (Yp) بیشترین مقدار مربوط به اکوتیپ بهار ۲ و کمترین میزان آن مربوط به اکوتیپ امامزاده‌کوه (توئیجین) می‌باشد. در خصوص شاخص تحمل (TOL) بیشترین مقدار مربوط به اکوتیپ سولان و کمترین میزان آن مربوط به اکوتیپ اسدآباد می‌باشد. جدول ۶، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای شاخص‌های تحمل به خشکی را نمایش می‌دهد. مؤلفه اول ۸۲/۴ درصد از تغییرات کل را توجیه می‌کند و هر دو مؤلفه اول و دوم توامان ۹۴ درصد از تغییرات ایجاد شده را توجیه نمودند. در پژوهش‌های مختلف به‌منظور بررسی شاخص‌های تحمل به خشکی از روش آماری تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شده است (Kakaei &Kakaei, 2009 , Moosavi, 2017). جدول ۷ ضرایب همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی، عملکرد سوخ در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی را نشان می‌دهد. بر اساس جدول همبستگی، همبستگی بین عملکرد در شرایط نرمال رطوبتی (Yp) با صفات عملکرد در شرایط تنش خشکی (Ys) و شاخص‌های MP، GMP، HAM، YI، ATI، YSI و STS دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار می‌باشد و با شاخص های DI و SSI دارای همبستگی منفی و معنی‌دار می‌باشد و همچنین شاخص‌های GMP، HAM، YI، ATI، YSI، STS، DI و SSI دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار با شاخص MP می‌باشد. که این نتایج حاصله از همبستگی شاخص‌ها با یکدیگر نشان‌دهنده ارتباط و همبستگی شاخص‌ها با هم می‌باشند. که محققین بسیاری از تجزیه همبستگی شاخص‌ها به‌عنوان ابزاری مفید در مطالعه شاخص‌های تحمل به خشکی استفاده کرده‌اند (Kakaei, 2012; Kakaei, 2023). استفاده از تجزیه همبستگی برای گزینش جهت بهبود یک یا چند صفت، نتایج مطلوب و مناسبی را به همرا دارد. لذا همبستگی و نحوه اثر صفات بر یکدیگر بایستی در برنامه‌های به‌نژادی مورد توجه قرار گیرد (Kakaei, 2023). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۳ محققینی از تجزیه آماری همبستگی جهت مطالعه و ارزیابی روابط بین صفات استفاده نمودند و آن را روش مناسبی جهت تصمیم‌گیری‌های اصلاحی اعلام کردند (Kakaei & Mazahery Laqab, 2023). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۲۱ از همبستگی برای مطالعه ارتباط بین ناهنجاری‌های کلی کروموزومی و غلظت فلزات سنگین استفاده کردند و نتایج این رابطه را تحلیل نمودند (Hajmoradi & Kakaei, 2021). در تحقیقی (Kakaei & Ahmadian, 2021) از رابطه بین صفات ملکولی در اکوتیپ‌های مختلف یونجه استفاده کردند و تجزیه رابطه آماری را مفید اعلام نمودند. بر اساس شکل ۱ اکوتیپ‌های بهار ۲، سولان و اسدآباد در گروه A قرار دارند و دارای عملکرد مطلوب در هر دو شرایط محیطی می‌باشند و سایر اکوتیپ‌ها یعنی اکوتیپ‌های امامزاده‌کوه (توئیجین)، مریانج و بهار ۱ دارای عملکرد پایینی در هر دو شرایط محیطی می‌باشند. در شکل ۲ نمودار بای‌پلات اکوتیپ‌های شماره بهار ۲ و سولان در نزدیک شاخص‌های STI، ATI، GMP و MP که شاخص‌های تحمل به خشکی می‌باشند، قرار دارند. این دو اکوتیپ (بهار ۲ و سولان) بر اساس نمودار سه بعدی نیز در گروه اول قرار گرفتند پس نتیجه می‌شود که بر اساس نمودار بای‌پلات همچنین این اکوتیپ‌ها، اکوتیپ‌های مطلوب و شاخصی بوده‌اند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای شکل ۳، اکوتیپ‌های به دو گروه آماری دسته‌بندی شده‌اند گروه اول شامل اکوتیپ‌های مریانج، بهار ۱ و امامزاده‌کوه (توئیجین) و گروه دوم شامل اکوتیپ‌های بهار ۲، سولان و امامزاده‌کوه (توئیجین) می‌باشند. در گروه اول اکوتیپ‌هایی با عملکرد کمتر و در گروه دوم اکوتیپ‌هایی با عملکرد بالاتر و مناسب‌تر قرار گرفته‌اند. تجزیه تابع تشخیص در جدول ۷ گروه‌های آماری جدول تجزیه واریانس را به‌طور کامل و صددرصد مورد تأیید قرار داده است. محققین بسیاری از تجزیه کلاستر و تجزیه تابع تشخیص در مطالعات خود استفاده کرده‌اند و این روش‌ها را روش‌هایی مناسب برای تجزیه‌های آماری اعلام کرده‌اند. به‌طور کلی و بر اساس کلیه تجزیه‌های آماری مورد استفاده در پژوهش، به‌ترتیب اکوتیپ‌های بهار ۲ و سولان، بیشترین عملکرد زیست‌توده را به خود اختصاص دادند.

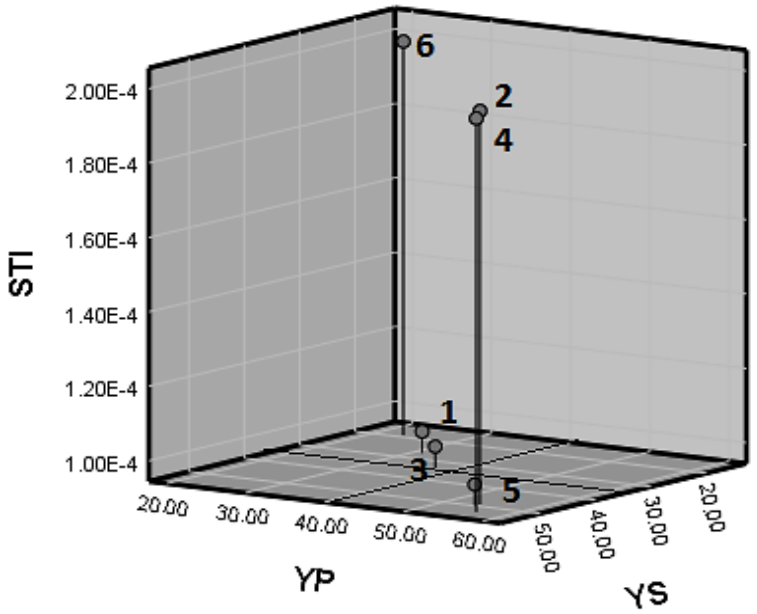
جدول ۳- تجزیه واریانس عملکرد در شرایط تنش و بدون تنش خشکی و شاخص‌های تحمل به خشکی در اکوتیپ‌های سیر

Table 3- ANOVA for the yield under drought stress and non-drought stress conditions and drought tolerance indices for the garlic ecotypes

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares						
		YP	YS	STI	TOL	SSI	MP	GMP
تکرار Replication	2	44.39	47.27	1.624	0.167	0.009	45.789	46.015
اکوتیپ Ecotype	5	589.653**	600.305**	1.58**	0.9ns	0.054**	594.754**	597.388**
خطا Error	10	28.985	23.303	1.154	1.367	0.007	25.802	25.71
ضریب تغییرات (CV%)		4.04	4.08	0.21	0.158	0.038	4.06	4.07
		HAM	YI	ATI	YSI	DI	STS	
تکرار Replication	2	46.24	2.399	288.968	0.001	0.001	192.686	
اکوتیپ Ecotype	5	600.004**	3.047**	4938.282ns	0.007**	0.010**	2436.851**	
خطا Error	10	25.621	1.183	1956.989	0.001	0.001	93.237	
ضریب تغییرات (CV%)		4.09	0.29	11.72	0.013	0.016	8.22	

به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.** و*، ns

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



شکل ۱- گزینش اکوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی با استفاده از شاخص تحمل تنش (STI) و شاخص میانگین هندسی بهره‌وری (GMP)

Figure 1- Selection of drought tolerant ecotypes of garlic plant using Stress Tolerance Index (STI) and Geometric Mean Productivity (GMP)

جدول ٤- شاخص‌های تحمل خشکی در اکوتیپ‌های سیر مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی

Table 4- Drought tolerance indices of the studied garlic ecotypes under drought and non-drought stress conditions

شماره اکوتیپ Ecotype number	YP	YS	STI	TOL	MP	GMP	HMP	YI	ATI	YSI	STS	DI	SSI
1	30.74 ±4.4 bc	26.4 ±4.3 cd	0.0001 ±0.0001	4.33 ±0.577 ab	28.57 ±4.35 cd	28.48 ±4.36 cd	28.4 ±4.37 cd	0.0059 ±0.0097 bc	79.32 ±17.12 c	0.86 ±0.022 b	53.18 ±8.69 c	-0.824 ±0.026 b	0.396 ±0.062 b
2	55.96 ±7.51 a	52.63 ±7.99 a	0.0002 ±0.0002	3.33 ±0.577 c	54.29 ±7.75 a	54.26 ±7.76 a	54.23 ±7.77 a	0.011 ±0.001 a	114.32 ±9.6 b	0.94 ±0.018 a	106 ±16.06 a	-0.92 ±0.020 a	0.17 ±0.051 e
3	37.1 ±2.68 b	33.1 ±2.68 c	0.0001 ±0.0001	4 ±0.0001 b	35.1 ±2.68 c	35.04 ±2.68 c	34.98 ±2.69 c	0.0075 ±0.0006 b	89.83 ±6.9cd	0.89 ±0.007 b	66.74 ±5.4 b	-0.86 ±0.009 b	0.3 ±0.021 bc
4	53.64 ±9.1 a	48.64 ±7.52 b	0.0002 ±0.0002	5 ±1.73 a	51.14 ±8.3 ab	51.08 ±8.27 ab	51.017 ±8.24 ab	0.011 ±0.001 a	169.253 ±86.11 a	0.9 ±0.017 ab	97.88 ±14.97 ab	-0.88 ±0.015 ab	0.255 ±0.047 c
5	53.73 ±4.08 a	49.73 ±3.08 ab	0.0001 ±0.0001	1.73 ±1 d	51.73 ±3.58 ab	51.69 ±3.5 ab	51.65 ±3.55 ab	0.011 ±0.0007 a	134.02 ±42.42 ab	0.93 ±0.013 a	100.15 ±6.11 a	-0.9 ±0.011 a	0.205 ±0.036 d
6	22.9 ±2.56 c	18.57 ±2.82 d	0.0002 ±0.0001	4.33 ±1.52 ab	20.73 ±2.58 d	20.61 ±2.6 d	20.48 ±2.63 d	0.0042 ±0.0006 c	56.88 ±20.63 d	0.8 ±0.063 b	37.29 ±5.86 d	-0.76 ±0.064 c	0.529 ±0.176 a

شکل گسترده اسامی اکوتیپ در جدول ۱ و اسامی شاخص‌های مرتبط با خشکی در جدول ۲ آمده است.

The expanded form of ecotype names is given in Table 1 and the names of indicators related to drought are given in Table 2.

جدول ۵- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای شاخص‌های متحمل به خشکی اکوتیپ‌های سیر

Table 5- Principal component analysis for drought tolerant indices of garlic ecotypes

مؤلفه Component	مقدار ویژه Eigenvalue	واریانس Variance	شاخص‌های تحمل خشکی Drought tolerant indices										
			STI	TOL	SSI	MP	GMP	HMP	YI	DI	ATI	STS	YSI
1	10.715	82.4	0.019	-0.14	0.015	0.3	0.305	0.305	0.304	0.225	0.261	0.305	0.293
2	1.511	94	-0.731	-0.58	0.469	-0.06	-0.059	-0.059	-0.056	-0.328	-0.23	-0.051	0.172

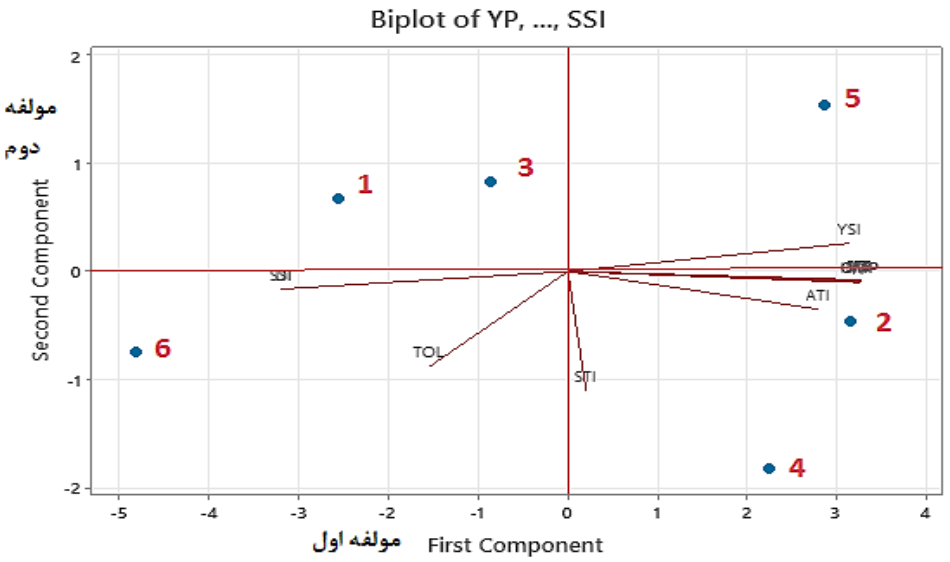
شکل گسترده اسامی شاخص‌های مرتبط با خشکی در جدول ۲ آمده است.

The extended form of the names of drought-related indicators is given in Table 2.

جدول ٦- ضرایب همبستگی شاخص‌های متحمل به خشکی با عملکرد در شرایط تنش و عدم تنش در اکوتیپ‌های سیر

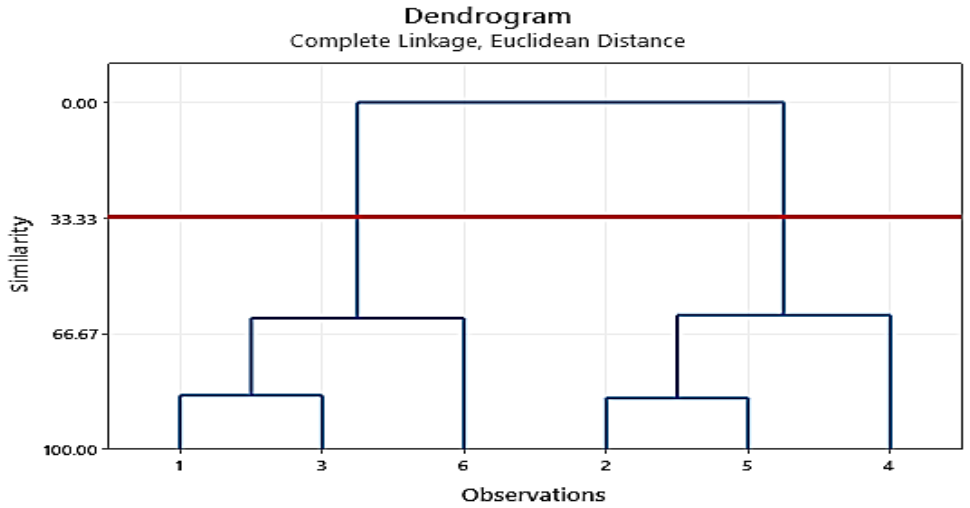
Table 6- Correlation coefficients drought tolerant indices with yield in stress (Ys) and non-stress (Yp) conditions in garlic ecotypes

	YP	YS	STI	TOL	MP	GMP	HAM	YI	ATI	YSI	STS	DI	SSI
YP	1												
YS	0.999**	1											
STI	0.142	0.137	1										
TOL	-0.423	-0.442	0.415	1									
MP	1**	1**	0.140	-0.433	1								
GMP	1**	1**	0.139	-0.43	1**	1							
HAM	1**	1**	0.138	-0.42	1**	1**	1						
YI	0.998**	0.995**	0.11	-0.43	0.997**	0.997**	0.997**	1					
ATI	0.878*	0.859*	0.168	-0.126	0.868*	0.868*	0.868*	0.898*	1				
YSI	0.932**	0.940**	-0.142	-0.539	0.936**	0.936**	0.937**	0.929**	0.713	1			
STS	0.999**	1**	0.135	-0.443	1**	1**	1**	0.995**	0.858*	0.941**	1		
DI	-0.949**	-0.955**	0.075	0.480	-0.952**	-0.952**	-0.953**	-0.945**	-0.745	-0.997**	-0.956**	1	
SSI	-0.954**	-0.96**	0.072	0.493	-0.957**	-0.958**	-0.958**	-0.952**	-0.756	-0.996**	-0.961**	0.999**	1



شکل ۲- نمودار بای‌پلات دو مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در آزمون شاخص‌های تحمل خشکی در اکوتیپ‌های سیر

Figure 2- Bi-plot diagram of the first two components of principal component analysis of drought tolerant indices in garlic ecotypes



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای کلیه شاخص‌ها به روش WARD برای اکوتیپ‌های سیر

Figure 3- Dendrogram results from cluster analysis for all indices by WARD method for garlic ecotypes

جدول ۷- نتایج تجزیه تابع تشخیص برای گروه‌بندی بر اساس شاخص‌های مورد مطالعه اکوتیپ‌های سیر

Table 7- Discriminant analysis in order to grouping of garlic ecotypes based on the studied indices

Groups resulting from cluster analysis گروه‌های حاصل از تحلیل خوشه‌ای	Predicted groups based on the decomposition of the detection function گروه‌های پیش‌بینی شده بر اساس تجزیه تابع تشخیص					
	1		2		Total	
	Number تعداد	Percent درصد	Number تعداد	Percent درصد	Number تعداد	Percent درصد
1	3	100	0	100	3	100
2	0	100	3	100	3	100

نتیجه‌گیری

نتایج کلی این تحقیق بیانگر نقش بسیار مهم و مفید شاخص‌های تحمل خشکی برای تفکیک اکوتیپ‌های مورد مطالعه بود. به‌طور کلی و بر اساس کلیه تجزیه‌های آماری مورد استفاده در پژوهش به‌ترتیب اکوتیپ‌های بهار ۲ و سولان بیشترین عملکرد زیست‌توده را داشتند.

سپاسگزاری

از همه‌ی عزیزانی که در شکل‌گیری گزارش حاضر نقش ایفا کردند سپاسگزاری می‌کنم.

References

1. Blum, A. (1988). *Plant breeding for stress environments*. CRC. Press. Boca Raton, Fl. pp. 38-78. 5. Bouslama, M. and W.T. Schapaugh. 1984. Stress tolerance in soybean. Part 1: evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science, 24*, 933-937.
2. Bouslama, M., & Schapaugh, W.T. (1984). Stress tolerance in soybean. I: Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science, 24*, 933-937.
3. Esmaeili, A., Najaphy, A., & Kahrizi, D. (2022). Evaluation of drought tolerance in Camelina (*Camelina sativa*) doubled haploid lines using selection index of ideal genotype (SIIG). *Journal of Crop Breeding, 14*(44), 199-210. https://jcb.sanru.ac.ir/article-1-1364-fa.html
4. Farshadfar, E., & Sutka, J. (2002). Screening drought tolerance criteria in maize. *Acta Agronomica Hungarica, 50*(4), 411-416.
5. Fernandez, G.C.J. (1992). *Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance*. In: Proceedings of on the Symposium Taiwan, August 13-18. 25: 257-270.
6. Fernandez, G.C.J. (1992). *Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance*. In: Kuo, C.C. (Ed.), Procof an International Symposium on Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress AVRDC, Shanhua, Taiwan.
7. Fischer, R.A., & Maurer, R. (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain Yield Responses. *Australian Journal of Agricultural Research, 29*, 897-912.
8. Fisher, R.A., & Maurer, R. (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars grain yield response. *Australian Journal of Agricultural Research, 29*, 897-912.
9. Hajmoradi, F., & Kakaei, M. (2021). Genotoxic effects of heavy metals on mitotic chromosomes of *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Genetics Resources, 7*(2), 265-271. https://doi.org/10.22080/jgr.2021.21814.1263
10. Kakaei, M., & Mazaheri Laqab, H. (2023). Genetic analysis of path coefficients of some traits in relation with tolerance to alfalfa leaf weevil (*Hypera postica* Gell.). *Journal of Genetics Resources, 9*(1), 83-91. https://doi.org/10.22080/jgr.2023.24987.1343
11. Kakaei, M. (2019a). Evaluation of terminal drought stress tolerance in Lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Crop Production and Processing, 8*(4), 59-71. (In Persian). https://doi.org/10.29252/jcpp.8.4.59
12. Kakaei, M. (2023). Selection of old and new varieties of bread wheat tolerant to drought stress after the flowering stage. *Journal of Crop Breeding, 16*(46), 172-185. (In Persian). https://doi.org/10.61186/jcb.15.46.189
13. Kakaei, M. (2009). *Studying the effect of genotype and drought stress on the physiological, morphological, phenological and biochemical characteristics of autumn rapeseed*. Master's thesis in Plant Breeding, Islamic Azad University.
14. Kakaei, M. (2019b). Study of relationship among seed proteins pattern with quantitative traits in some of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Pulses Research*, 10(1), 12-27. (In Persian). https://doi.org/10.22067/ijpr.v10i1.57457
15. Kakaei, M. (2023). *Evaluation of the phenotypic relationship of native stands of Iranian garlic under rainfed conditions.* 13th Iranian Horticultural Science Congress 18-21 September 2023, Gorgan, Iran.
16. Kakaei, M. (2023). Selection of old and new varieties of bread wheat tolerant to drought stress after the flowering stage. *Journal of Crop Breeding, 16*(46), 68-79.
17. Kakaei, M., & Ahmadian, S. (2021). Genetic diversity study of some Iranian alfalfa genotypes based on seed storage proteins patterns. *Iranian Journal of Science and Technology Transactions, A Science* https://doi.org/10.1007/s40995-021-01142-z
18. Kakaei, M., & Moosavi, S.S. (2017). Assessing genetic diversity and selection of effective traits on yield of Chickpea lines using multivariate statistical methods. *Environmental Sciences, 2*(2), 21-38.
19. Kakaei, M., Zebarjadi, A., Mostafaie, A., & Rezaie zad, A. (2010). Identification of genotypes tolerant to drought stress in rapeseed using tolerance indices. *Electronic Journal of Crop Production, 3*(4), 107-124. (In Persian)
20. Kakaei, M., Mazahery Laghab, H., Zebarjadi, A.R., & Mahdavi Damghani, A.M. (2012). Evaluation of tolerance to drought stress in some bread wheat genotypes. *Plant Production Technology, 4*(1), 1-14. (In Persian)

21. Khalili, D. (2016). Challenges facing water resources management under drought conditions in Iran. *Strategic Research Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, *1*(2), 149-164. (In Persian)
22. Moosavi, S.S., Yazdi Samadi, B., Naghavi, M.R., Zali, A.A., Dashti, H., & Pourshahbazi, A. (2008). Introduction of new indices to identify relative drought tolerance and resistance in wheat genotypes. *Desert Journal*, *12*, 165-178.
23. Oosthuizen, C.B., Reid, A.M., & Lall, N. (2018). Chapter 9 - Garlic (*Allium sativum*) and Its Associated Molecules, as Medicine. *Medicinal Plants for Holistic Health and Well Being* 277-295. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812475-8.00009-3
24. Rosielle, A.A., & Hamblin, A.M.J. (1981). Theoretical aspects of selection for yield in stress and non- stress environments. *Crop Science*, *21*, 943-946.
25. Wilhite, D.A. (1993). Planning for drought: A methodology, In: Wilhite, D.A. (Ed.) Drought Assessment, Management, and Planning: *Theory and Case Study*, *6*, 87-108.

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 551-562

Investigating the Use of Mycorrhiza and Trichoderma Fungi on Rhizome Yield and Active Ingredients of Ginger

F. Rezvaninia[1], M.T. Ebadi[1*], N. Safaie[2]

1- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mt.ebadi@modares.ac.ir)
2- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 07-12-2023
Revised: 19-04-2024
Accepted: 20-04-2024
Available Online: 20-04-2024

How to cite this article:
Rezvaninia, F., Ebadi, M.T., & Safaie, N. (2023). Investigating the use of mycorrhiza and Trichoderma fungi on rhizome yield and active ingredients of ginger. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 551-562. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85675.1308

Introduction

Ginger (*Zingiber officinale*) is a perennial and monocotyledonous medicinal and spice plant, whose rhizome, essential oil and extract are of interest, and this plant has wide uses in various industries. The origin of ginger is Southeast Asia and possibly India. This plant is mainly cultivated as an annual and the rhizome or the underground stem is the used part. It should be noted that the use of biological fertilizers can improve the growth and yield of plants and is also the most natural and best way to keep soil systems healthy. In addition, benefiting from natural solutions instead of using chemicals reduces pollution and destruction of biological resources. The use of Arbuscular mycorrhizal and Trichoderma fungi can leads to a reduction in the consumption of fertilizers and fungicides and an increase in yield, and also reduces production costs and is compatible with environmental principles. Therefore, the main purpose of this study was to investigate the effects of *Trichoderma harizanum*, mycorrhiza (*Glomus etunicatum* and *G. fasciculatum*) and the combined treatment of fungi (*G. etunicatum* + *T. harizanum*, *G. fasciculitum* + *T. harizanum*) on the growth parameters, rhizome yield and active substances of ginger.

Materials and Methods

This research was conducted as a factorial experiment based on a completely random design in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. The rhizomes were transferred to the greenhouse and cultivated in pots with amended soil. These plants were inoculated with Trichoderma (*T. harizanum*), Mycorrhiza (*G. etunicatum* and *G. fasciculatum*) and combined treatment of fungi (*G. etunicatum* + *T. harizanum*, *G. fasciculatum* + *T. harizanum*). During the growing season and harvesting, the morphological characteristics and rhizomes yield were evaluated, and then the essential oil content and composition, the amount of fiber and the color of the rhizomes and precisely. The effect of treatments on ginger stem traits contains: Stem Fresh Weight (g), Stem Dry Weight (g), Number of Stems and Stem Length (cm), Leaf Traits contains: Leaf Dry Weight (g), Leaf Fresh Weight (g), Number of Leafs, Greenness Index, Rhizome Traits contains: Rhizome Dry Weight (g), Rhizome Fresh Weight (g), Darkness/Lightnees Indicator, Yellow/Blue Indicator, Rhizome Crude Fiber (%), Essential oil Traits contains: Essential oil Percentage, Essential oil Yield were investigated. Abbreviation of treatments include contains: Control, M1 (*G. fasciculatum*), M2 (*G. etunicatum*), T1 (*T. harizanum*), M1T1 (*G. fasciculitum* + *T. harizanum*) and M2T1 (*G. etunicatum* + *T. harizanum*).

Results and Discussion

The results showed that the inoculation with *G. etunicatum* had the highest value of stem length (35.68 cm), fresh and dry weight of the stem (22 and 10.2 g), Spad index (18.17), fresh and dry weight of leaves (34.46 and 8.96 g), number of leaves (9.46) and fiber content of rhizome (4.28%). Also, the highest number of stems,

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85675.1308

darkness/brightness index and yellow/blue color index of rhizome were observed in the control treatment with values of 7.16, 73.29 and 98.6 respectively. The highest fresh and dry weight of rhizome (35.5 and 5.2 g) were observed in the inoculation with *G. fasciculitum* treatment and the highest percentage of essential oil (0.4) was observed under the combined treatment of the inoculation with *G. etunicatum*. Camphene, 1,8-cineole, neral and geranial were identified as the main compounds of essential oil and the amounts of these compounds in the inoculation treatment with fungi were more than the control. In general, this research showed that the inoculation of rhizomes with *G. etunicatum* resulted in achieving the desired growth characteristics, rhizome yield and active substances in ginger. Camphene, 1,8-cineole, neral and geranial were identified as the main compounds of essential oil and the amounts of these compounds in the inoculation treatment with fungi were more than the control.

Conclusion

In general, this research showed that the inoculation of rhizomes with *G. etunicatum* resulted in achieving the desired growth characteristics, rhizome yield and active substances in ginger.

Keywords: Biofertilizer, Essential oil, Quality, Spice plant

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۵۱-۵۶۲

بررسی کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر عملکرد ریزوم و مواد مؤثره گیاه زنجبیل

فائزه رضوانی نیا[۱]- محمّدتقی عبادی[۱*]- ناصر صفایی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱

چکیده

زنجبیل گیاهی دارویی و ادویه‌ای است که ریزوم، اسانس و عصاره آن مورد توجه می‌باشد. مطالعات متعددی، تأثیر مثبت تلقیح گیاهان با قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما را بر مؤلفه‌های رشد و عملکرد گزارش نموده‌اند. لذا، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی بر روی گیاه زنجبیل انجام شد. فاکتورها شامل تلقیح گیاهان با قارچ‌های تریکودرما (*Trichoderma harizanum*)، مایکوریزا (*G. etunicatum* و *Glomus fasciculatum*) و تلفیق قارچ‌ها بودند. هنگام برداشت، صفات ریختی و عملکرد ریزوم ارزیابی گردید و سپس خصوصیات کیفی نظیر رنگ، میزان فیبر، درصد و اجزای اسانس ریزوم‌ها بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار صفت طول ساقه (۳۵/۶۸ سانتی‌متر)، وزن تر و خشک ساقه (۲۲ و ۱۰/۲ گرم)، شاخص سبزینگی (۱۸/۱۷)، وزن تر و خشک برگ (۳۴/۴۶ و ۸/۹۶ گرم)، تعداد برگ (۹/۴۶ عدد) و فیبر ریزوم (۴/۲۸ درصد) به تیمار تلقیح با مایکوریزا اتونیکیتوم تعلق داشت ولی بیشترین تعداد ساقه، شاخص تیرگی/روشنایی و شاخص رنگ زرد/آبی ریزوم در تیمار شاهد به‌ترتیب با مقادیر ۷/۱۶، ۷۳/۲۹ و ۹۸/۶ مشاهده شد. بیشترین وزن تر و خشک ریزوم (۳۵/۵ و ۵/۲ گرم) تحت تیمار مایکوریزا فاسیکولیتوم و بالاترین میزان اسانس (۰/۴ درصد) تحت تیمار تلفیق مایکوریزا اتونیکیتوم با تریکودرما مشاهده شد. کامفن، ۱و۸-سینئول، نرال و ژرانیال به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس شناسایی شدند و میزان آنها در تیمار تلقیح با قارچ‌ها بیشتر از شاهد بود. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار تلقیح ریزوم‌ها با قارچ مایکوریزا اتونیکیتوم سبب دستیابی به میزان مطلوب صفات رشد، عملکرد ریزوم و مواد مؤثره در گیاه زنجبیل گردید.

واژه‌های کلیدی: اسانس، کود زیستی، کیفیت. گیاه ادویه‌ای

مقدمه

گیاهان دارویی از هزاران سال گذشته به‌عنوان منبعی برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند و در حال حاضر هم به‌عنوان یک روش مراقبت اولیه، تقریباً توسط ۸۵ درصد از مردم جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Fitzgerald *et al.*, 2020). تیره زنجبیلیان (Zingiberaceae) شامل حدود ۵۲ سرده و ۱۵۸۷ گونه است که در این میان سرده زنجبیل (*Zingiber*) دارای ۱۴۴ گونه می‌باشد (Garza-Cadena *et al.*, 2023). زنجبیل (*Zingiber officinale* Roscoe.) یک گیاه دارویی و ادویه‌ای به‌صورت تک‌لپه و چندساله است که مصارف گسترده‌ای در صنایع مختلف دارد (Jabborova *et al.*, 2021) و عملکرد اسانس این گیاه در ریزوم تازه بین ۰/۵ تا ۱ و در ریزوم خشک بین ۱ الی ۳ درصد می‌باشد (Rahmani *et al.*, 2014). این گیاه یک گونه تجاری مهم بوده و از دیرباز در چین و هند به‌عنوان منبع دارو و ادویه مورد استفاده قرار گرفته است. در حال حاضر زنجبیل در بسیاری از نقاط جهان کشت شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیشتر تحقیقات در مورد این گیاه، تاکنون بر روی خواص دارویی و بیوشیمی متابولیت‌های ثانویه متمرکز بوده‌اند (Liu *et al.*, 2020).

در کشاورزی، نوآوری‌های جدیدی برای افزایش عملکرد محصولات به کار گرفته می‌شوند که متأسفانه بسیاری از آن‌ها تأثیر مخربی بر محیط‌زیست می‌گذارند. بنابراین چالشی که کشاورزی نوین با آن روبه‌رو است، دستیابی به عملکرد بالا با استفاده از شیوه‌های سازگار با محیط‌زیست است (Nur & Noor, 2020). از آنجایی‌که

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mt.ebadi@modares.ac.ir)
۲- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85675.1308

استفاده بیش‌ازحد از کودها و آفت‌کش‌ها اثرات منفی بر اکوسیستم دارد، بنابراین نیاز مبرم به استفاده از تکنیک‌های سازگار با محیط زیست وجود دارد مانند استفاده از قارچ‌های همزیست گیاهان. قارچ‌هایی نظیر مایکوریزا و تریکودرما معمولاً به‌عنوان کود زیستی شناخته شده و موجب افزایش بهره‌وری محصولات می‌شوند و اعتقاد بر این است که تلقیح گیاه با این قارچ‌ها باعث افزایش تحمل گیاهان میزبان در مقابل شرایط مختلف تنش‌زا مانند گرما، شوری، خشکی، فلزات سنگین و ... می‌شود و مواد مغذی ضروری مورد نیاز گیاه را تأمین می‌کند و در نتیجه منجر به بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Begum *et al.*, 2019). بر اساس پژوهش‌ها می‌توان بیان نمود که، گونه‌های قارچ تریکودرما با مکانیسم‌های خاصی موجب بهبود رشد می‌شوند که از این مکانیسم‌ها می‌توان به ترشح آنزیم برای کنترل بیماری‌های خاکزی، برطرف نمودن مسمومیت، بهبود انتقال اسیدآمینه و قند در ریشه، افزایش مقاومت در مقابل تنش‌های محیطی، بهبود جذب عناصر، تولید هورمون‌ها و شبه هورمون‌های مفید برای رشد و همچنین تولید آنزیم‌هایی که می‌توانند موجب افزایش مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زا شوند اشاره نمود (Gravel *et al.*, 2007). به اعتقاد بسیاری از پژوهشگران، پراهمیت‌ترین اثر همزیستی مایکوریزا آربوسکولار، بهبود جذب عناصر معدنی به‌خصوص فسفر در گیاه می‌باشد که تأثیر مثبتی بر رشد ریشه و ریزوم ها دارد (Rejali *et al.*, 2019).

یکی از مشکلات عمده در مسیر توسعه کشت گیاه زنجبیل، حساسیت این گیاه به برخی عوامل بیماری‌زای قارچی نظیر فوزاریوم است که سبب پوسیدگی ریزوم‌ها و از بین رفتن گیاه می‌شوند. در حال حاضر، استفاده از موجودات خاکزی سودمند به‌عنوان عوامل کنترل‌کننده بیماری‌ها و همچنین کود زیستی، مطلوب‌ترین و طبیعی‌ترین راه برای رفع این‌چنین مشکلاتی در کشاورزی است. به‌کارگیری قارچ‌های مایکوریزا آربوسکولار و تریکودرما منجر به کاهش مصرف سموم و افزایش عملکرد کمی می‌شود و همچنین هزینه‌های تولید را کاهش داده و سازگار با اصول زیست‌محیطی می‌باشد (Hatef Heris *et al.*, 2020). هدف اصلی این پژوهش بررسی تأثیرات قارچ‌های تریکودرما (*Trichoderma harizanum*)، مایکوریزا (*G. etunicatum* و *Glomus fasciculatum*) و تیمار تلفیقی قارچ‌ها (اتونیکیتوم+تریکودرما، فاسیکولیتوم+تریکودرما) بر شاخصه‌های رشد، عملکرد ریزوم و مواد مؤثره گیاه زنجبیل بود.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی

در این تحقیق از دو گونه قارچ مایکوریزا (*G. etunicatum* و *Glomus fasciculatum* – شرکت زیست‌فناور توران) و یک جدایه از قارچ تریکودرما (*Trichoderma harizanum* – محصول تریکوران پی، شرکت بایوران) به‌عنوان تیمار استفاده شد و گیاه بکار رفته نیز زنجبیل با منشا کشور چین بود. ریزوم‌های زنجبیل از میدان میوه و تره بار مرکزی تهران خریداری گردیدند و این پژوهش در آذرماه سال ۱۴۰۰ با کشت ریزوم‌های زنجبیل در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس شروع شد. در تیرماه ۱۴۰۱ برداشت این گیاهان صورت پذیرفت و پس از آن بررسی و ارزیابی صفات ریختی و فیتوشیمیایی در آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی و مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

نحوه کشت و اعمال تیمارها

پس از تحریک جوانه‌زنی ریزوم‌ها در یک محیط‌کشت موقت شامل پرلیت و کوکوپیت، ریزوم‌ها از محیط‌کشت خارج شده و به قطعات حدود ۵۰ گرمی با حداقل ۳ جوانه فعال تقسیم و پس از شسته شدن با آب، با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شدند و در کیسه‌های رشد قرار گرفتند. محیط کشت اصلی شامل کود دامی، خاک و پرلیت (به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲) آماده شده و داخل کیسه‌های رشد ریخته شد. در این آزمایش، ۶ تیمار (جدول ۱) با ۳ تکرار به‌صورت فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفتند (عامل اصلی: مایکوریزا، عامل فرعی: تریکودرما) که جهت اطمینان از نتایج، هر تکرار شامل ۳ عدد گلدان بود. نحوه اعمال تیمارها به این صورت بود که، ۵۰ گرم از قارچ مایکوریزا روی بستر کشت پخش شده و ریزوم قطعه شده روی آن بستر قرار گرفته و با الباقی محیط‌کشت پوشانده شد. اما روش تیمار با قارچ تریکودرما متفاوت بود به این صورت‌که، ۲۰ گرم از این قارچ را داخل ۲ لیتر آب مقطر حل کرده و ریزوم‌ها را داخل آن قرار داده و پس از ۱۰ دقیقه ریزوم‌ها را خارج کرده و در کیسه‌های رشد کشت شدند و محلول باقی‌مانده هم به میزان مساوی به‌صورت آبیاری به گیاهان داده شد. گروه شاهد نیز بدون هیچ‌گونه تلقیح قارچی کشت شدند (شکل ۱). کیسه‌های رشد تا زمان برداشت در گلخانه باقی‌مانده و در طول دوره رشد، آبیاری منظم و تنظیم شرایط محیطی از نظر نور (نور طبیعی با شدت تنظیم شده توسط سایه بان به میزان ۱۰ هزار لوکس به‌مدت ۱۲ تا ۱۴ ساعت در شبانه روز)، دما (روز: ۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد، شب: ۵±۲۰ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی (۱۰±۷۰ درصد) انجام گرفت (شکل ۲).

جدول ۱- علامت اختصاری تیمارها

Table 1- Abbreviation of the treatments

تیمار Treatment	علامت اختصاری Abbreviation
شاهد Control	Control
مایکوریزا فاسیکولیتوم *Fasciculatum*	M1
مایکوریزا اتونیکیتوم *Etunicatum*	M2
تریکودرما *Trichoderma*	T1
مایکوریزا فاسیکولیتوم+تریکودرما *Trichoderma+Fasciculatum*	M1T1
مایکوریزا اتونیکیتوم+تریکودرما *Trichoderma+Etunicatum*	M2T1

شکل ۱- کشت ریزوم‌های جوانه‌زده زنجبیل در محیط کشت اصلی

Figure 1- Cultivation of ginger rhizomes in the main culture medium

شکل ۲- وضعیت گیاهان زنجبیل در طول رشد و برداشت آن‌ها

Figure 2- Ginger plants during their growth and harvest

صفات ریختی و فیزیولوژیک

پس از حدود ۸ ماه، برداشت بوته‌ها انجام پذیرفت و تعداد ساقه‌ها، برگ‌ها و ریزوم‌های موجود در هر کیسه رشد شمارش شدند و همچنین اندازه‌گیری وزن تر و خشک ساقه‌ها، برگ‌ها و ریزوم‌ها (عملکرد ریزوم در بوته) توسط ترازوی دیجیتال با دقت یک‌هزارم انجام گرفت. ارتفاع ساقه با خط‌کش و شاخص سبزینگی با استفاده از دستگاه سبزینه‌سنج مدل (502, Minolta, Japan) اندازه‌گیری شد.

صفات کیفی

رنگ ریزوم

رنگ ریزوم‌ها به‌وسیله عکس‌برداری در داخل چادر مخصوص عکاسی و آنالیز تصاویر با نرم‌افزار Color analyzer ارزیابی شد. بدین منظور، ابتدا تعدادی از ریزوم‌های هر تیمار به قطعات باریک تقسیم شده و داخل آون (دمای ۴۰ درجه به‌مدت ۴۸ ساعت) قرار داده شده و پس از خارج کردن از آون، داخل آسیاب ریخته و پودر شدند و پس از آن عکس‌برداری صورت گرفت و سپس تصاویر به‌دست آمده در نرم‌افزار آنلاین تعیین رنگ بارگذاری شده و میزان شاخص زرد/آبی (b) و شاخص روشنایی و تیرگی (L) برای آن‌ها محاسبه شد.

فیبر خام ریزوم

تعدادی از ریزوم‌های هر تیمار به قطعات باریک تقسیم گردید و داخل آون (دمای ۴۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت) قرار داده شده و پس از خارج کردن از آون، داخل آسیاب ریخته و پودر شدند، سپس با استفاده از ترازو دیجیتال با دقت یک ده‌هزارم، یک گرم از ریزوم پودر شده هر تیمار جدا شده و داخل نایلون ریخته و به آزمایشگاه مرکزی منتقل شد. در ادامه ظرف‌های مخصوص دستگاه تست فیبر (Fibertec)، با ترازو دیجیتال با دقت یک ده‌هزارم، وزن شدند. پس از آن، محلول سود ۱/۲۵ درصد و همچنین محلول اسید سولفوریک ۱/۲۵درصد ساخته شد و داخل دستگاه تست فیبر قرار داده شدند. در ادامه، نمونه‌ها داخل ظروف ریخته شده و داخل دستگاه تست فیبر قرار گرفتند و به‌مدت ۳۰ دقیقه با سود ۱/۲۵ درصد در حالت جوشش بودند و پس از آن با آب مقطر شسته شده و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه با اسیدسولفوریک ۱/۲۵ درصد جوشیدند و مجدد با آب مقطر شسته شده و پس از آن، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و داخل دسیکاتور قرار گرفتند تا مقداری خنک شوند و سپس به آون (دمای ۱۳۰ درجه به مدت ۲ ساعت) منتقل شدند و بعد از خارج شدن از آون مجدد داخل دسیکاتور قرار داده شده و پس از خنک شدند. وزن آن‌ها مجدد با ترازو دیجیتال با دقت یک ده‌هزارم اندازه‌گیری شد و سپس نمونه‌ها به داخل کوره منتقل شده و در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ ساعت باقی ماندند. و در آخر، پس از خروج از کوره داخل دسیکاتور خنک شده و وزن آن‌ها با ترازو دیجیتال با دقت یک ده‌هزارم، اندازه‌گیری شد و سنجش میزان فیبر با استفاده از فرمول (۱) انجام گرفت.

(۱)

$$\text{درصد فیبر خام} = \frac{\text{وزن نمونه بعد از کوره} - \text{وزن نمونه بعد از آون}}{\text{وزن اولیه نمونه}} \times ۱۰۰$$

درصد و عملکرد اسانس

برای سنجش درصد وزنی وزنی اسانس، ابتدا ریزوم‌های تازه را به قطعات کوچک برش داده و با ترازو دیجیتال با دقت یک‌هزارم، ۱۰۰ گرم از آن وزن شده و به همراه ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بالن‌ها ریخته و به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر (حرارت دهی به‌مدت ۳ ساعت) اسانس آن‌ها استخراج شد. پس از رطوبت‌زدایی آن‌ها، اسانس خالص به‌دست آمده وزن شد و در نهایت درصد وزنی وزنی اسانس‌ها محاسبه گردید. جهت اندازه‌گیری عملکرد اسانس، درصد اسانس هر تیمار در عملکرد وزن خشک آن تیمار ضرب گردید و عملکرد بر حسب گرم در گلدان گزارش شد.

اجزای اسانس

دستگاه کروماتوگراف گازی مدل 7890B ساخت شرکت Agilent و مجهز به آشکارساز FID بود. طول ستون HP-5، ۳۰ متر و قطر داخلی ستون ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بوده و برنامه‌ریزی حرارتی از ۶۰ تا ۲۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت افزایش ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دقیقه صورت گرفت. دمای قسمت تزریق برابر ۲۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و دمای آشکارساز برابر ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردیده بود. گاز حامل هلیم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه کروماتوگراف گازی مدل TRACE MS ساخت شرکت Termoquest-Finnigan متصل شده به دستگاه طیف‌سنج جرمی Quadrupole و ستون HP-5MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه‌ریزی حرارتی و نوع و سرعت گاز حامل و دمای محفظه تزریق، مانند دستگاه GC تنظیم گردید. شناسایی ترکیبات اسانس با مقایسه طیف جرمی هر پیک با ترکیبات استاندارد در کتابخانه دستگاه (Adams، Wiley و Main library) و همچنین محاسبه شاخص بازداری و مطابقت هر ترکیب با منابع از طریق تزریق هیدروکربن‌های نرمال (C8-C24) تحت شرایط یکسان به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SAS و همچنین برای رسم نمودارهای مربوطه نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد و میانگین-ها به‌وسیله آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

صفات مربوط به ساقه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر قارچ مایکوریزا و تریکودرما و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر طول ساقه گیاه زنجبیل معنی‌دار نبود. همچنین تأثیر قارچ مایکوریزا و تریکودرما بر روی تعداد ساقه نیز معنی‌دار نبود اما اثر متقابل قارچ‌ها بر روی تعداد ساقه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. علاوه بر این تأثیر قارچ مایکوریزا بر روی وزن تر و خشک ساقه معنی‌دار نبود ولی اثر متقابل قارچ‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر قارچ تریکودرما بر وزن تر و خشک ساقه نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که، در تیمار M2T0 بیشترین طول ساقه (۳۵/۶۸ سانتی‌متر) مشاهده شد که با تیمار شاهد (۲۷/۵۳ سانتی‌متر) اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین طول ساقه در تیمار M2T1 به میزان ۲۰/۷۶ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. بیشترین تعداد ساقه تحت تیمار M2T0 (۷/۰۸) مشاهده شد که با تیمار شاهد (۷/۱۶) اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین تعداد ساقه در تیمار M2T1 (۴/۶۶) مشاهده شد. همچنین، بالاترین وزن تر ساقه متعلق به تیمار M2T0 (۲۲ گرم) بود که با تیمار شاهد (۲۱/۳۳ گرم) اختلاف معنی‌داری نشان نداد و کمترین وزن تر ساقه مربوط به تیمار M1T1 (۱۶/۳۳ گرم) بود. بیشترین وزن خشک ساقه نیز در تیمار M2T0 (۱۰/۲ گرم) مشاهده شد که با تیمار شاهد (۹/۶۷ گرم) اختلاف معنی‌داری نشان نداد و کمترین وزن خشک ساقه مربوط به تیمار M1T1 (۶/۷۵ گرم) بود (جدول ۲).

صفات مرتبط با برگ

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که، اثر قارچ مایکوریزا و تریکودرما بر روی شاخص سبزینگی معنی‌دار نبود اما اثر متقابل قارچ‌ها در این صفت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اثر مایکوریزا بر تعداد برگ معنی‌دار نبود ولی اثر تریکودرما و اثر متقابل قارچ‌ها در این صفت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین تأثیر قارچ مایکوریزا و اثر متقابل قارچ‌ها بر روی وزن تر و وزن خشک برگ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود اما تأثیر تریکودرما بر وزن تر و خشک برگ معنی‌دار نبود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که، تیمار M2T0 بالاترین شاخص سبزینگی (۱۸/۱۷) را داشت که با میزان شاخص سبزینگی در تیمار شاهد (۱۵/۷) دارای اختلاف معنی‌داری نبود و کمترین میزان این صفت در تیمار M1T1 برابر با ۱۱/۰۷ بود. بیشترین تعداد برگ در تیمار با M2T0 به میزان ۸/۹۶ مشاهده شد که با تیمار شاهد (۸/۴۲)، اختلاف معنی‌داری نداشت و تیمار M2T1 (۵/۹)، دارای کمترین تعداد برگ بود. تیمار M2T0 بالاترین وزن تر برگ به میزان ۳۴/۴۶ گرم را سبب گردید که با تیمار شاهد (۲۸/۵۳ گرم)، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نداشت و کمترین میزان این صفت در تیمار M2T1 به میزان ۲۴ گرم بود. علاوه بر این، تیمار با M2T0 بالاترین وزن خشک برگ (۹/۴۶ گرم) را حاصل نمود که با تیمار شاهد (۷/۳۳ گرم)، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نداشت و کمترین میزان این صفت در تیمار M2T1 به میزان ۵/۲ گرم مشاهده شد (جدول ۳).

صفات مرتبط با ریزوم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که، اثر قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر وزن تر و خشک ریزوم معنی‌دار نبود اما اثر متقابل قارچ‌ها در این صفات تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. اثر مستقیم و متقابل قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما در سطح احتمال ۵ درصد بر روی رنگ ریزوم معنی‌دار بود. علاوه بر این، تأثیر قارچ مایکوریزا بر فیبر ریزوم معنی‌دار نبود اما اثر مستقیم تریکودرما و اثر متقابل قارچ‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر نوع قارچ می‌توان بیان نمود که، تیمار M1T0 با ۳۵/۵ گرم، بالاترین وزن تر را ایجاد نمود که با تیمار شاهد (۳۱/۰۳ گرم) اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین کمترین وزن تازه به مربوط به M2T1 با ۱۶ گرم بود. تیمار M1T0با ۵/۲ گرم بالاترین وزن خشک ریزوم را ایجاد نمود که با تیمار شاهد (۴/۸۵ گرم) اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین کمترین وزن خشک ریزوم نیز به مربوط به M1T1 با ۲/۷۷ گرم بود. بیشترین میزان شاخص L (شاخص تاریکی/روشنایی: بین ۰ تا ۱۰۰ است و مقادیر بالاتر به مفهوم رنگ روشن‌تر ریزوم هستند) مربوط به تیمار M2T0 و برابر با ۷۱/۴۸ بود که با تیمار شاهد (۷۳/۲۹) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت و کمترین مقدار در این صفت مربوط به تیمار M0T1 با مقدار ۵۱/۸۹ بود. بیشترین میزان شاخص b (شاخص زرد/آبی: مقادیر مثبت و بالاتر به مفهوم تمایل بیشتر به رنگ زرد است) مربوط به تیمار M2T0 و برابر با ۹۳/۴ بود که با تیمار شاهد (۹۸/۶) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت و کمترین مقدار در این صفت مربوط به تیمار M0T1 (۶۰/۲) بود. علاوه بر این، تیمار M2T0 با ۴/۲۸ گرم بالاترین میزان فیبر

خام را داشت که با تیمار شاهد (۴/۲۲ گرم) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. کمترین میزان فیبر خام مربوط به تیمار M2T1 با مقدار ۴ گرم بود (جدول ۴).

درصد و عملکرد اسانس

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر مستقیم قارچ مایکوریزا و تریکودرما و اثر متقابل قارچ‌ها بر روی درصد وزنی وزنی اسانس در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. بالاترین درصد اسانس مربوط به تیمار M2T1 با ۰/۴۲۵ درصد بود که با تیمار شاهد (۰/۱۳۵ درصد) اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد داشت همچنین کمترین درصد اسانس مربوط به تیمار M1T0 با ۰/۰۹۴ درصد بود. بیشترین عملکرد اسانس (۰/۰۷ گرم در گلدان) در تیمار تلقیح با T1 حاصل شد که فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمار با M2T1 بود و کمترین میزان در تیمار M1 مشاهده شد که با تیمار شاهد و M1T1 اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۵).

جدول ۲- اثر کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر صفات مربوط به ساقه زنجبیل

Table 2- The effect of Mycorrhiza and Trichoderma fungi on ginger stem traits

تیمارها Treatments	وزن تر ساقه Stem fresh weight (g)	وزن خشک ساقه Stem dry weight (g)	تعداد ساقه Number of stems	طول ساقه Stem length (cm)
Control	21.33 ab	9.67 ab	7.16 a	27.53 ab
M1	20.66 ab	9 ab	6.33 a	32.27 ab
M2	22 a	10.2 a	7.08 a	35.68 a
T1	17.33 ab	8.9 ab	6.66 a	31.27 ab
M1T1	16.33 b	6.75 b	4.93 a	28.91 ab
M2T1	16.66 b	6.98 b	4.66 a	20.76 b

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر مبنای آزمون LSD می‌باشد.

Similar letters indicate the absence of a significant difference at the 5% of probability level based on the LSD test.

جدول ۳- اثر کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر صفات مرتبط با برگ زنجبیل

Table 3- The effect of Mycorrhiza and Trichoderma fungi on ginger leaf traits

تیمارها Treatments	وزن خشک برگ Leaf dry weight (g)	وزن تر برگ Leaf fresh weight (g)	تعداد برگ Number of leaf	شاخص سبزینگی Greenness index
Control	7.33 ab	28.53 ab	8.42 a	15.7 ab
M1	5.9 b	26 b	8.33 a	17.10 ab
M2	9.46 a	34.46 a	8.96 a	18.17 a
T1	7.4 ab	28 ab	7.86 ab	16 ab
M1T1	5.33 c	24.15 c	6.13 b	11.07 b
M2T1	5.2 c	24 c	5.9 b	12.29 b

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر مبنای آزمون LSD می‌باشد.

Similar letters indicate the absence of a significant difference at the 5% of probability level based on the LSD test.

جدول ٤- اثر کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر صفات مربوط به ریزوم زنجبیل

Table 4- The effect of Mycorrhiza and Trichoderma fungi on ginger rhizome traits

تیمارها Treatments	وزن خشک ریزوم Rhizome dry weight (g)	وزن تر ریزوم Rhizome fresh weight (g)	شاخص تیرگی/روشنایی Darkness/Lightnees index	شاخص زرد/آبی Yellow/Blue index	فیبر خام ریزوم Rhizome crude fiber (%)
Control	4.85 a	31.03 a	73.29 a	98.6 a	4.22 a
M1	5.2 a	35.5 a	68.18 ab	85 ab	4.17 a
M2	4.65 a	32.82 a	71.48 ab	93.4 ab	4.28 a
T1	5.04 a	35.13 a	51.89 d	60.2 d	4.12 a
M1T1	2.77 b	17.03 b	67.03 b	77.5 b	4.19 a
M2T1	2.95 b	16 b	59.3 c	66.4 c	4 a

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر مبنای آزمون LSD می‌باشد.

Similar letters indicate the absence of a significant difference at the 5% of probability level based on the LSD test.

جدول ۵- اثر کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما بر صفات مربوط به اسانس زنجبیل

Table 5- The effect of Mycorrhiza and Trichoderma fungi on ginger essential oil traits

تیمارها Treatments	درصد اسانس Essential oil percentage	عملکرد اسانس Essential oil yield
Control	0.135 e	0.04 c
M1	0.094 f	0.03 c
M2	0.153 d	0.05 b
T1	0.198 c	0.07 a
M1T1	0.233 b	0.04 c
M2T1	0.425 a	0.06 ab

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر مبنای آزمون LSD می‌باشد.

Similar letters indicate the absence of a significant difference at the 5% of probability level based on the LSD test.

ترکیبات اسانس

تجزیه اسانس زنجبیل منجر به شناسایی ۲۴ ترکیب شد. از ترکیبات عمده شناسایی‌شده در اسانس زنجبیل می‌توان به کامفن، ۱و۸-سینئول، نرال و ژرانیال اشاره نمود. این ترکیبات در تمامی تیمارهای اعمال شده شناسایی شدند و کامفن بیشترین درصد را در تمامی تیمارهای موردنظر داشت. بیشترین مقدار کامفن (۲۱/۲۵ درصد) در تیمار تلفیق مایکوریزا فاسیکولیتوم با تریکودرما مشاهده شد و بیشترین مقدار ۱و۸-سینئول (۱۱/۷۶ درصد) و نرال (۱۰/۵۱ درصد) متعلق به تیمار مایکوریزا فاسیکولیتوم بود. علاوه بر این، بیشترین مقدار ژرانیال (۱۲/۱۲ درصد) در تیمار تلفیق مایکوریزا فاسیکولیتوم با تریکودرما اندازه‌گیری شد که درصد این ترکیبات در تیمار شاهد به‌ترتیب برابر با ۱۹/۶۴، ۸/۱۰، ۶/۰۲ و ۹/۳۱ درصد بود. شایان ذکر است که، درصد مجموع ترکیب‌های شناسایی‌شده در تیمارهای مذکور از ۸۴/۶ تا ۹۱/۹ درصد متغیر بود.

درصد فراوانی صفات مطلوب

درصد فراوانی صفات مطلوب (فراوانی بیشترین مقدار صفت مورد نظر یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار با بیشترین مقدار) ابزاری برای جمع‌بندی نتایج در یک مطالعه تجربی می‌باشد. این مؤلفه در تیمارهای اعمال شده از ۲۱/۴۲ تا ۹۲/۸۵ درصد متغیر بود که بیشترین میزان آن مربوط به تیمار مایکوریزا اتونیکیتوم و شاهد و کمترین مقدار آن، مربوط به تیمارهای تلفیقی بود (جدول ۶).

بحث

در مطالعات مختلفی به تأثیر مثبت کاربرد قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما در رشد و عملکرد محصولات کشاورزی، مخصوصاً گیاهان دارویی و ادویه‌ای اشاره شده است. به‌طور مثال، نتایج گزارشی نشان داد که تلقیح گیاهچه های شوید با قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما سبب بهبود شاخصه‌های رشد و عملکرد کمی گردید (Hatef Heris *et al.*, 2020). آزمایشی جهت تحلیل تأثیرات قارچ‌های مایکوریزا آربوسکولار بر رشد زنجبیل در گلخانه انجام گرفت که در این تحقیق، گیاهچه‌های زنجبیل با ۱۲ گونه مختلف از قارچ مایکوریزا تیمار شدند. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های زنجبیل تیمار شده با مایکوریزا نسبت به شاهد، رشد بهتری داشتند (Qian *et al.*, 2019). همزیستی ریشه با قارچ مایکوریزا موجب بهبود جذب آب و عناصر غذایی، بهبود فتوسنتز و به دنبال آن، بهبود صفات رشدی مانند ارتفاع و همچنین تولید فراورده‌های بیشتر می‌شود (Khalvati *et al.*, 2005). علاوه بر این، استفاده از قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما می‌تواند موجب بهبود قدرت سازگاری و رقابتی گیاه، از طریق مسیرهای بیوشیمیایی دخیل در تولید هورمون‌های رشد یا به‌وسیله افزایش جذب عناصر غذایی شود (Zhang *et al.*, 2006). اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که صفات شاخصه‌های رشد (ساقه، برگ و ریزوم) تحت تیمارهای اعمال شده، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند. و در نتیجه می‌توان بیان نمود که، تیمارهای تلقیح با قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما احتمالاً به‌دلیل شرایط محیط‌کشت، اقلیم و نوع ژنوتیپ زنجبیل موجب افزایش معنی‌داری در میزان این صفات نسبت به تیمار شاهد نشده‌اند.

جدول ٦- درصد فراوانی صفات مطلوب در تیمارهای قارچ‌های مایکوریزا و تریکودرما اعمال شده

Table 6- Frequency percentage of desired traits in applied Mycorrhiza and Trichoderma fungi treatments

	Control	M1	M2	T1	M1T1	M2T1
طول ساقه Stem length (cm)						
تعداد ساقه Number of stems						
وزن تر ساقه Stem fresh weight (g)						
وزن خشک ساقه Stem dry weight (g)						
شاخص سبزینگی Greenness index						
تعداد برگ Number of leaf						
وزن تر برگ Leaf fresh weight (g)						
وزن خشک برگ Leaf dry weight (g)						
وزن تر ریزوم Rhizome fresh weight (g)						
وزن خشک ریزوم Rhizome dry weight (g)						
شاخص تیرگی/ روشنایی Darkness/Lightnees index						
شاخص زرد/آبی Yellow/Blue index						
فیبر خام ریزوم Rhizome crude fiber (%)						
درصد اسانس Essential oil percentage						
عملکرد اسانس Essential oil yield						
درصد فراوانی صفات مطلوب Frequency percentage of desired traits	92.85	78.57	92.85	78.57	21.42	21.42

خانه‌های سیاه رنگ بیانگر بیشترین مقدار صفت مورد نظر، خانه‌های خاکستری رنگ نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار با بیشترین مقدار هر صفت و خانه‌های سفید بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار با بیشترین مقدار هر صفت می‌باشند.

Black cells:the highest value of the attribute, gray cells : the absence of significant difference with the highest value of each attribute, and white cells : the presence of significant difference with the highest value of each attribute.

ریزوم زنجبیل به رنگ زرد متمایل به سفید معروف است. در مطالعه‌ای، ۶۲ نوع ریزوم زنجبیل که از ارقام و توده‌های مختلف بودند، برای تجزیه و تحلیل ترکیبات رنگ‌دانه زرد به کار گرفته شدند. نتایج نشان داد که کورکومین، دمتوکسی کورکومین و ۶-دهیدروژن گردیون ترکیبات اصلی ایجادکننده رنگ زرد در این گیاه هستند. همچنین طبق این پژوهش می‌توان بیان نمود که، رنگ‌دانه‌های زرد ریزوم زنجبیل، بیشتر تحت تأثیر شرایط کشت و به میزان کمتر تحت تأثیر نوع رقم می‌باشند. همچنین محتوای این ترکیبات در ریزوم‌های بالغ بیشتر از ریزوم‌های نابالغ بود. بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که، تراکم این ترکیبات تحت تأثیر شرایط کشت، مرحله بلوغ ریزوم و نوع رقم می‌باشد (Iijima & Joh, 2014). در پژوهش حاضر نیز میزان رنگ ریزوم در مرحله بلوغ افزایش یافت و بنابراین با نتایج پژوهش ذکر شده مطابقت داشت. علاوه بر این، تیمارهای فاسیکولیتوم و اتونیکیتوم اختلاف معنی‌داری را از نظر شاخص تیرگی/روشنایی و شاخص زرد/آبی نسبت به تیمار شاهد ایجاد نکردند ولی سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری مقادیر کمتر نسبت به تیمار شاهد را نشان دادند. میزان فیبر در ریزوم زنجبیل تازه حدود ۲/۴ درصد و در ریزوم زنجبیل پودر شده بین ۳ الی ۸ درصد است (Bardlin *et al.*, 2008). نتایج حاصل از بررسی درصد فیبر خام در تحقیق حاضر با پژوهش ذکر شده مطابقت داشت و علاوه بر این، تیمارهای اعمال شده، اختلاف معنی‌داری را با شرایط شاهد نشان ندادند.

در تحقیق حاضر، درصد اسانس تحت تیمار تلفیق مایکوریزا اتونیکیتوم با تریکودرما، افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد که با نتایج سایر محققین در خصوص گیاهان اسانس دار مطابقت داشت. به‌طور مثال، استفاده از دو گونه قارچ مایکوریزا بر روی گیاه رازیانه موجب افزایش اسانس به مقدار ۷۸ درصد نسبت به تیمار شاهد شد (Kapoor *et al.*, 2002). همچنین نتایج پژوهشی بر روی گیاه زنیان هم نشان‌دهنده تأثیرات سودمند استفاده از قارچ میکوریزا بر روی مقدار اسانس این گیاهان بوده است (Ghilavizadeh *et al.*, 2013). افزایش درصد اسانس با استفاده از تلقیح گیاهان با برخی قارچها می‌تواند به‌دلیل گسترش سیستم ریشه، موجب بهبود جذب عناصر غذایی بخصوص عناصر کم‌مصرف که تأثیر شگرفی بر بیوسنتز ترکیبات ترپنی در گیاهان دارند، باشد (Del Rosario Cappellari *et al.*, 2013). همچنین تأثیر قارچهای همزیست با ریشه گیاهان در تولید هورمون‌های محرک رشد در گیاهان می‌تواند در بیوسنتز مواد مؤثره در گیاهان دارویی و ادویه‌ای مؤثر باشد (Banchio *et al.*, 2008; Abou El-Yazeid *et al.*, 2007). در خصوص اجزای اسانس، در تعداد زیادی از مطالعات پیشین نتایج مثبتی در مورد افزایش اجزای اصلی اسانس در اثر کاربرد قارچهای مایکوریزا و تریکودرما مشاهده شده است (Arpanahi *et al.*, 2020; Akachoud *et al.*, 2022; Kapoor *et al.*, 2002) که در این تحقیق نیز نتایج مشابهی حاصل شد و اجزای اصلی اسانس زنجبیل (کامفن، ۱و۸-سینئول، نرال و ژرانیال) در اکثر تیمارهای موردمطالعه دارای مقادیر بالاتری نسبت به تیمار شاهد بودند. البته باید اشاره نمود که در بسیاری از آزمایشات، مهمترین اجزای اسانس زنجبیل آلفا-زینجیبرن، بتا-سسکوئی فلاندرن، کورکیومن، آلفا-فارنزن و بتا بیسابلن گزارش شده است ولی در این تحقیق به‌دلیل استفاده از روش تقطیر با آب و کوتاه‌تر بودن روش اسانس‌گیری، این ترکیبات با مقادیر کمتر از ۵ درصد مشاهده شدند (Garza-Cadena *et al.*, 2023).

نتیجه‌گیری

زنجبیل در سال‌های اخیر مهم‌ترین و پرفروش‌ترین ادویه در بازار تجارت جهانی بوده است و لذا انجام پژوهش‌های کاربردی در خصوص مباحث به زراعی آن جهت توصیه به کشاورزان ایرانی جهت تولید در مناطق دارای اقلیم گرمسیری ضرورت ویژه‌ای دارد. استفاده از قارچهای همزیست جهت افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زا و بهبود رشد و نمو گیاهان، موضوعی مهم در تولید پایدار گیاهان دارویی و ادویه‌ای است. در این پژوهش که با هدف بررسی اثرات قارچهای مایکوریزا و تریکودرما و تلفیق آن‌ها بر روی خصوصیات رشد، عملکرد ریزوم و مواد مؤثره گیاه زنجبیل انجام گرفت، نتایج نشان داد که، تیمار با مایکوریزا (مخصوصا گونه اتونیکیتوم) می‌تواند تأثیر مثبتی بر عملکرد کمی و کیفی این محصول ارزشمند ادویه‌ای داشته باشد.

References

1. Abou El-Yazeid, A., Abou-Aly, H.E., Mady, M.A., & Moussa, S.A.M. (2007). Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (Biophos-phor®) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, *3*(4), 274-286.
2. Akachoud, O., Bouamama, H., Facon, N., Laruelle, F., Zoubi, B., Benkebboura, A., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2022). Mycorrhizal inoculation improves the quality and productivity of essential oil distilled from three aromatic and medicinal plants: *Thymus satureioides*, *Thymus pallidus*, and *Lavandula dentata*. *Agronomy*, *12*(9), 2223. https://doi.org/10.3390/agronomy12092223

3. Arpanahi, A.A., Feizian, M., Mehdipourian, G., & Khojasteh, D.N. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improve essential oil and physiological parameters and nutritional values of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. under normal and drought stress conditions. *European Journal of Soil Biology*, *100*, 103217. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103217
4. Banchio, E., Bogino, P.C., Zygadlo, J., & Giordano, W. (2008). Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, *36*(10), 766-771. https://doi.org/10.1016%2Fj.bse.2008.08.006
5. Bardlin, H.A., Blunden, G., Tanira, MO., & Nemmar, A. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinal* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 409-420. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.085
6. Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Ishfaq, Khan, M., Ashraf, M., Ahmed, N., & Zhang, L. (2019). Role of Arbuscular Mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science Journal*, *10*, 1068. https://doi.org/10.3389%2Ffpls.2019.01068
7. Del Rosario Cappellari, L., Santoro, M.V., Nievas, F., Giordano, W., & Banchio, E. (2013). Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, *70*, 16-22. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.001
8. Fitzgerald, M., Heinrich, M., & Booker, A. (2020). Medicinal plant analysis: A historical and regional of emergent complex techniques. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1480. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01480
9. Garza-Cadena, C., Ortega-Rivera, D.M., Machorro-García, G., Gonzalez-Zermeño, E.M., Homma-Dueñas, D., Plata-Gryl, M., & Castro-Muñoz, R. (2023). A comprehensive review on Ginger (*Zingiber officinale*) as a potential source of nutraceuticals for food formulations: Towards the polishing of gingerol and other present biomolecules. *Food Chemistry*, 135629. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135629
10. Ghilavizadeh, A., Darzi, M.T., & Haj Seyed Hadi, M. (2013). Effects of biofertilizer and plant density on essntial oil content and yield traits of Ajowan (*Carum copticum*). *Middle-East Journal of Scientific Research*, *14*(11), 1508-1512.
11. Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R.J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, *39*, 1968–1977. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015
12. Hatef Heris, H., Zehtab Salmasi, S., & Arzanlou, M. (2020). Effect of some Trichoderma and Mycorrhizal fungai species on growth properties and grain yield of dill (*Anethum graveolens* L.) under greenhouse conditions, *Agricultural Knowledge and Sustainable Production Journal*, *30*(1), 191-209. (In Persian with English abstract)
13. Iijima, Y., & Joh, A. (2014). Pigment composition responsible for the Pale yellow color of ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes. *Food Science and Technology Research*, *20*(5), 971-978. https://doi.org/10.3136/fstr.20.971
14. Jabborova, D., Enakiev, Y., Sulaymanov, K., Kadirova, D., Ali, A., & Annapurna, K. (2021). Plant growth promoting bacteria *Bacillus subtilis* promote growth and physiological parameters of *Zingiber officinale* Roscoe. *Horizon e-Publishing Group*, *8*(1), 66–71.
15. Kapoor, R., Giri, B., & Mukerji, K.G. (2002). *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*, 459-463. https://doi.org/10.1023/A:1015522100497
16. Khalvati, M.A., Mzafar, A., & Schmidhalter, U. (2005). Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hypha and its signification for leaf growth, water relations and gas exchange of barley subjected to drought stress. *Plant Biology Stuttgart*, *7*(6), 706-712. https://doi.org/10.1055/s-2005-872893
17. Liu, H., Specht, CH.D., Tong, Z., & Liao, J. (2020). Morphological anatomy of leaf and rhizome in *Zingiber officinale* Roscoe, with emphasis on secretory structures. *Ashs Journals*, *55*(2), 1-4. https://doi.org/10.21273/HORTSCI14555-19
18. Nur, A.Z., & Noor, A.B. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, *65*, 168-178. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003
19. Qian, W., Bao, H., Zhang, J., Song, J., Liu, Z., Huang, J., & Chen, T. (2019). Effects of different arbuscular Mycorrhizal fungi species on the growth of ginger. *Chinese Journal of Tropical Crops*, *40*(7), 1272-1277.
20. Rahmani, A.H., Alshabrmi, F.M., & Aly, S.M. (2014). Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, *6*(2), 125-136.
21. Rejali, F., Esmaeilizad, A., & Saghafi, K. (2019). Effect of symbiosis interaction of Mycorrhizae arbuscular on mineral uptake in wheat (*Pishtaz cultivar*), *Iranian Journal of Field Crop Science*, *49*(4), 51-65. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068
22. Zhang, H.W., Song, Y.C., & Tan, R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, *23*, 753-77. https://doi.org/10.1039/B609472B

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 563-575

Optimization of Tissue Culture Medium and the Combination of Growth Regulators to Increase Plantlet Production Efficiency in Walnut Micropropagation

M. Ghorbani[1*], K. Parvizi[2], M. Yazdandoost Hamedani [3], D. Hassani[4]

1 and 2- Ms Degree of Biotechnology in Agriculture and Associate Professor, Horticulture Crops Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: ghorbanimarzieh25@yahoo.com)
3- Assistant Professor of Seed and Plant Certification and Registration Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran
4- Retired Professor of Agricultural Engineering, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organizations, Karaj, Iran

Received: 16-01-2024
Revised: 18-04-2024
Accepted: 04-05-2024
Available Online: 06-05-2024

How to cite this article:
Ghorbani, M., Parvizi, K., Yazdandoost Hamedani, M., & Hassani, D. (2024). Optimization of tissue culture medium and the combination of growth regulators to increase plantlet production efficiency in walnut micropropagation. *Journal of Horticultural Science, 38*(3), 563-575. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86286.1318

Introduction

In our country, walnut tree propagation is traditionally done through seed cultivation, often resulting in seed rot and death due to fungal, bacterial, and viral contamination (MC Granahan *et al.*, 1986; Driver & Kenyuki, 1984; Saadat & Henry, 2002). The traditional method, in addition to low multiplication rates, leads to high variation in resulting seedlings, potential loss of seedlings due to contamination, and reduced efficiency in subsequent stages (Unit, 2012; Kaur *et al*., 2006). Previous research has mainly utilized concentrations of one milligram per liter of benzyl adenine along with small amounts of indole butyric acid for Iranian walnut growth and enrichment (Rodrigues, 1982; Revilla *et al*., 1989; Penuela, 1988; Mejzadeh *et al.*, 2010, 1997; Amiri & Qaraati, 2012; Riosleal *et al*., 2012). This research aims to build upon and optimize previous work, evaluating the effectiveness of different concentrations of two growth regulators, benzyl aminopurine and adenine sulfate, on walnut plantlet regeneration and growth traits in tissue culture.

Materials and Methods

This study was conducted to optimize the tissue culture protocol for the "Chandler" cultivar walnut and determine the most suitable culture medium and hormonal composition for micropropagation. Lateral and terminal buds from the current season's branches were sterilized and cultured in DKW medium containing 2 mg/liter of benzyl adenine hormone and 100 mg/liter of indole butyric acid hormone, with polyvinyl pyrrolidine at one g/liter and activated charcoal at 2 g. Two-factorial experiments were used to process and multiply the plant after the establishment phase. The first factor was DKW culture medium containing five levels of adenine sulfate (0, 20, 40, 60, and 80 mg/liter), and the second factor was benzylaminopurine plant growth regulator with five hormonal levels containing 0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/liter in combination with 0.01 mg/liter of indole butyric acid hormone. DKW base culture medium without any plant growth regulating substances was considered as control. After two months, growth traits including plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets per plantlet were measured in different culture media. The resulting data were statistically analyzed using SAS 9.1 software, and means were compared using Duncan's multiple range test with a five percent probability level.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86286.1318

Results and Discussion

The analysis of variance showed that both plant growth regulators, benzyl aminopurine and adenine sulfate, had a very significant effect at 1% probability level on plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets. The interaction effect of benzyl aminopurine with adenine sulfate treatment on plantlet weight and stem length was significant at the 1% probability level. However, the interaction effect of benzyl aminopurine with adenine sulfate treatment on the number of leaves, number of buds, and number of leaflets was not significant. The results indicated that an increase in the levels of growth regulators benzyl aminopurine and adenine sulfate led to an increase in plantlet weight. The positive effects of increasing the levels of growth regulating substances in increasing plantlet weight are likely due to their direct effect on nutrient absorption, utilization, and the photosynthesis process. These results align with the research of Hatemzadeh *et al*. (2017) and Saadat and Henrati (2002). The positive effects of higher concentrations of both growth regulators on the increase in the number of sprouts and the lack of significant difference between the two high concentrations confirm that the use of high levels does not exceed the economic threshold. It can be justified that in excessive and unconventional concentrations, positive effectiveness is not achieved, but it can also impose more costs on the walnut tissue culture program. The appropriate concentration of BAP and adenine sulfate increases the leaf surface through the effect on cell divisions, resulting in receiving more light radiation and increasing the rate of photosynthesis. It seems that the two growth regulating substances in the appropriate concentration intensified each other's effect, affecting the rate of absorption and utilization of materials from photosynthesis, leading to an increase in the fresh and dry weight of the seedling. This, in turn, leads to a decrease in the length of the reproduction period in the resulting seedlings and an increase in the efficiency of the seedling production in walnut tissue culture.

Conclusion

The use of both studied growth regulators significantly increased plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets compared to the control treatment. Plantlet growth was achieved with the use of plant growth regulators, whereas no growth was observed in their absence. All assessed traits increased significantly with the addition of plant growth regulators, with the highest trait values obtained through the simultaneous use of benzylaminopurine and adenine sulfate.

Keywords: Growth traits, Plant growth regulators, Proliferation, Tissue culture

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۶۳-۵۷۵

بهینه‌سازی محیط‌کشت و ترکیب ماده تنظیم‌کننده رشد در افزایش راندمان تولید گیاهچه در ریزازدیادی گردو

مرضیه قربانی[۱*]- خسرو پرویزی[۲]- محمد یزدان دوست همدانی[۳]- داراب حسنی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵

چکیده

این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی دستورالعمل کشت بافت گردو و تعیین بهترین محیط‌کشت و ترکیب ماده تنظیم‌کننده رشدی در ریزازدیادی این گیاه، در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان اجرا شد. جوانه‌های جانبی و انتهایی گردو رقم 'چندلر'، از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری، برداشت شده و پس از مراحل سترون‌سازی در شرایط استریل داخل محیط‌کشت پایه DKW حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آدنین و مقدار ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم‌کننده رشد ایندول‌بوتریک‌اسید، ۱ گرم بر لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین و ۲ گرم ذغال فعال کشت شدند. پس از مرحله استقرار که با تورم و سرسبزی جوانه‌ها و عدم وجود هر نوع علائم نکروزه و رنگ‌پریدگی آن‌ها همراه بود، به‌منظور پرآوری، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. بدین‌منظور از محیط‌کشت DKW حاوی ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل‌آمینوپورین در پنج سطح با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک‌اسید به‌عنوان فاکتور اول و پنج سطح مختلف آدنین‌سولفات (صفر، ۲۰ و ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان فاکتور دوم، مورد استفاده قرار گرفت. پس از دو ماه شاخص‌های رشد شامل صفات وزن گیاهچه، طول ساقه نورسته، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه در هر گیاهچه، در محیط‌کشت‌های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، دو ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات اثر بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر صفات مورد بررسی نشان دادند. متناسب با افزایش غلظت در هر دو ماده تنظیم‌کننده رشد، میزان پرآوری و رشد گیاهچه‌ها افزایش پیدا کرد. به‌طوری که در محیط کشت‌های حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات در مقایسه با سایر غلظت‌ها، اثرات مثبت قابل توجهی در کلیه صفات مورد بررسی ایجاد گردید.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، صفات رشد، کشت بافت، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی

مقدمه

کشور ایران از رویشگاه‌های مهمی است که در آن گردو (*Juglans regia* L.) بصورت گسترده کشت می‌شود به‌طوری‌که در اکثر کشورها گردو را به نام گردوی ایرانی و به اصطلاح انگلیسی Persian Walnut می‌شناسند و به احتمال زیاد بذر آن در زمان‌های گذشته از ایران به برخی کشورهای دیگر منتقل شده است. مجموعه وسیعی از ژنوتیپ‌های مرغوب و نامرغوب در اکثر نقاط ایران از جمله همدان، قزوین، طالقان، آذربایجان، مازندران، سمنان، نجف آباد، فارس، کردستان، کرمان و ... به‌صورت مخلوط کشت می‌شود (Mohammadinejad *et al*., 2013). با استناد به آمارنامه کشاورزی (2020) سطح زیر کشت گردو در کشور ۱۶۵۱۰۰ هکتار و در استان همدان ۱۷۶۶۴ هکتار می‌باشد که بالاترین سطح زیر کشت گردو در

۱ و ۲- به‌ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران
(*- نویسنده مسئول Email: ghorbanimarzieh25@yahoo.com)
۳- استادیار پژوهشی واحد تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران
۴- استاد بازنشسته مهندسی کشاورزی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86286.1318

کشور را دارا می‌باشد. میزان تولید محصول و عملکرد آن در کشور به ترتیب ۲۶۱۲۶۲ تن، ۱۷۲۰ کیلوگرم در هکتار و در استان همدان ۶۳۰۲۵ تن و ۳۰۵۴ کیلوگرم در هکتار بوده و استان همدان رتبه اول را در تولید این محصول دارا می‌باشد (Anonymous, 2020). تولید نهال سالم گردو یکی از موضوعات مهمی است که در خصوص آن مطالعات گسترده‌ای انجام شده است. تکثیر درخت گردو در کشور ما اغلب به طریق سنتی از طریق جنسی (کشت بذر) انجام می‌گردد. تعداد زیادی از بذورکشت شده به‌دلیل وجود آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی دچار پوسیدگی شده و از بین می‌روند (Driver & Kuniyuki, 1984; Saadat & Hennerty, 2002).

در روش سنتی تکثیر گردو، معمولا در یک هکتار حدود ۱۰۰ هزار بذر کشت می‌گردد و در شرایط مطلوب می‌توان انتظار داشت که حداکثر حدود ۵۰ تا ۶۰ هزار نهال بدست آید. ضمن این‌که از یکنواختی برخوردار نیستند، با تأخیر قابل توجهی نیر در باردهی همراه می‌باشند. پیوند این پایه‌های بذری علاوه بر ضرورت تهیه پیوندک از ارقام سازگار و با ویژگی‌های برتر، به مراقبت‌های ویژه جهت جوش خوردن و ایجاد ترکیب پیوندی بادوام و پایدار نیز نیاز دارد. در مواردی هم ممکن است که با وجود آلودگی‌های بذرزاد سبب کاهش راندمان موفقیت در جوش خوردن پیوندک در مراحل پس از پیوند بشود (Leslie, 1988; McGranahan *et al*., 1986; McGranahan & Vahdati, 2005; Kaur *et al*., 2006). در مجموع ضریب پایین تکثیر و وجود آلودگی‌های پنهان از مهمترین مشکلات تکثیر بذری گردو می‌باشد (Driver & Kuniyuki, Somerz *et al*., 1982; 1984).

بوسلا و میکلر (Bosela & Michler, 2008) در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه دریافتند که بنزیل آدنین، تیدیازرون (TDZ) و زآتین (ZEA) هر سه بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها را فقط در غلظت ۵/۵–۱۲ میکرومولار بنزیل آدنین و غلظت ۵ –۲۵ میکرومولار زآتین مشاهده نمودند همچنین به برتری زآتین نسبت به بنزیل‌آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره نمودند اما اضافه نمودند که این تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین اتفاق افتاده و در غلظت‌های بالاتر، باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است.

وحدتی و همکاران (Vahdati *et al*., 2004)، در بررسی ریشه‌دار کردن و سازگاری جوانه‌های رشد یافته آزمایشگاهی در ارقام گردوی ایرانی، از سه رقم گردو Ghendler، Sunland و Vina و محیط کشت DKW حاوی 0.05 IBAμ +4.4 M BAμ و ۳۰ گرم ساکارز و ۲ گرم بر لیتر فیتاژل استفاده نمودند. پس از ۷ روز، جوانه‌ها با طول ۳–۴ سانتی‌متر برش داده شده و به‌مدت یک هفته به محیط کشت MS حاوی ۱۵ میکرومولار اسید ایندول‌بوتریک‌اسید و۳۰ گرم ساکارز و ۹ گرم بر لیتر آگار و تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از آن به‌مدت ۲۸ روز به روشنایی منتقل گردیدند. در ادامه فرآیند ریشه‌زایی، پس از ۲۸ روز، از محیط‌کشت DKW و ورمیکولیت با نسبت ۱ به ۱/۲۵ و ۳۰ گرم ساکارز و ۲ گرم فیتاژل که در اتوکلاو استریل گردید استفاده نمودند و گیاهچه‌های ریشه‌دار را تولید کردند.

وحدتی و همکاران (Vahdati *et al*., 2008) در تحقیق دیگری که به‌منظور بهینه¬سازی محیط‌کشت گردو انجام دادند، اعلام نمودند که برخی از ارقام گردو به مقدار مواد معدنی بیشتری از آنچه در محیط کشت DKW به کار رفته است نیاز دارند و استفاده از مقادیر بیشتر میواینوزیتول و مس می‌تواند در درصد رشد و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گردو مؤثر باشد.

پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (Paygamzadeh & Kazemitabar, 2011) اثر ماده تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین، اسیدایندول استیک‌اسید و ژنوتیپ را بر روی جنین‌های رسیده گردو بررسی نمودند و محیط‌کشت DKW حاوی مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و یا محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با مقدار ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را بهترین محیط‌کشت، برای تولید گیاهچه از جنین‌های رسیده معرفی نموده و به‌طور کلی اعلام نمودند هنگامی که از دو ماده تنظیم‌کننده رشد همزمان استفاده گردد، درصد جوانه‌زنی افزایش می‌یابد به‌نحوی‌که درصد جوانه‌زنی را در محیط اولی ۴۹/۳۲ ٪ و در دومی ۶۷/۷۶ ٪ گزارش نمودند.

در تحقیقی که توسط محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadinejad *et al*., 2013) بر روی ریزازدیادی گردو ژنوتیپ ۳۰۵ و Z60 انجام گرفت، اثر دو نوع محیط‌کشت DKW و WPM (۳۰ گرم بر لیتر ساکارز + ۸ گرم آگار + یک گرم بر لیتر پلی وینیل‌پیرولیدین PVP) و اثر سه غلظت ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین را با مقادیر صفر، ۰/۵ و یک میکرومولار را بررسی نمودند و محیط DKW را به‌عنوان محیط‌کشت برتر معرفی نمودند

یاری و همکاران (Yari *et al*., 2008) اثر فصل و نوع ریزنمونه را بر کشت گردو در شرایط *In vitro* بر روی رقم Z63 و Z60 بررسی نمودند. آن‌ها در زمان‌های مختلفی اقدام به نمونه‌گیری و کشت کردند و در نهایت بهترین زمان نمونه‌گیری را اواخر اردیبهشت ماه و بدترین زمان را مرداد ماه و تک گره برگی را به‌عنوان بهترین ریزنمونه معرفی نمودند.

احتشام نیا و غلامی (Ehteshamnia & Gholami., 2014) در بررسی میزان قهوه‌ای شدن بافت‌ها در شیوه‌های مختلف کشت بافت گردو، اثر دو محیط‌کشت MS و DKW حاوی ذغال فعال و

آسکوربیک اسید را بر روی دو رقم ایرانی چندلر و جمال بررسی نمودند و محیط‌کشت DKW حاوی ۲ گرم بر لیتر ذغال فعال را به عنوان بهترین محیط‌کشت معرفی نمودند. در آزمایش دیگری آنها جوانه‌ها را قبل از کشت به‌مدت ۲ ساعت در محلول‌های مختلف (آب، PVP و آسکوربیک اسید) قرار دادند و اعلام نمودند ریزنمونه‌های قرار گرفته در محلول PVP از نظر طول جوانه، وزن‌تر جوانه و تعداد برگ بهتر از نمونه‌های قرار گرفته در محلول آسکوربیک اسید بوده و همچنین این نمونه‌ها بهتر از آب عمل می‌کنند. این موضوع نشان می دهد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند PVP می‌تواند مانع قهوه‌ای شدن بافت‌ها در فرآیند کشت بافت گردد.

هاشمی دهکردی و همکاران (Hashemidehkordi *et al.*, 2020) استفاده همزمان از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات را در پینه‌زایی و اندام‌زایی در گیاه شیپوری گلدانی مؤثر دانسته‌اند. اثرات مفید آدنین سولفات در باززایی مریستم از کشت بافت سیب‌زمینی هنگامی‌که در ترکیب با BAP استفاده می‌شود، به اثبات رسیده است (Bhuiyan, 2013). استفاده همزمان از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات را در جهت القای اندام‌زایی در محیط‌کشت WPM در ریزازدیادی توس توسط نظری و همکاران (Nazari *et al.*, 2017) توصیه شده است. عرب و همکاران (Arab *et al.*, 2003) نیزاستفاده همزمان از محیط‌کشت MS حاوی ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم‌کننده رشد 2ip را در ریزازدیادی رویان خرمای مضافتی محیط مناسب معرفی نمودند.

یکی از بهترین راه‌کارها برای مبارزه با بیماری‌ها و احداث باغ‌های یکنواخت با خصوصیت ژنتیکی یکسان و تولید محصول یکنواخت و با ارزش و بازار پسندی بالا، جهت صادرات به بازارهای جهانی استفاده از تکنیک کشت بافت و ریزازدیادی آن‌ها می‌باشد. تا زمانی‌که تولید این‌گونه نهال‌ها به تعداد کافی و قیمت مناسب صورت نگیرد، امکان اصلاح باغات موجود و توسعه باغات فنی جدید در کشور وجود نخواهد داشت. از طرفی موفقیت در ریزازدیادی گردو و میزان پرآوری ریزنمونه‌ها و نیز درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل با نوع و ترکیب محیط‌کشت و غلظت‌های مختلف آن‌ها و درجه اکسایندگی ترکیبات محیط‌کشت در جذب و خنثی‌سازی تانن‌ها، آلکالوئیدها و دیگر موارد بازدارنده رشد ارتباط تنگاتنگ دارد. بنابراین این تحقیق با هدف تکمیل و بهینه‌سازی دستورالعمل قبلی و ارزیابی کارآیی غلظت‌های متفاوت از دو ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات بر میزان باززایی و نیز صفات رشد گیاهچه‌های تولیدی گردو در کشت بافت به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

ابتدا جوانه‌های جانبی و انتهایی گردو رقم 'چندلر'، از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری در اواخر اردیبهشت‌ماه، برداشت شدند. پس از جدا کردن برگ‌ها، ساقه‌های سالم و عاری از آفت و بیماری در محیط آزمایشگاه به قطعات کوچک تقسیم شده و به‌مدت یک ساعت در زیر آب جاری شسته شدند. سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر استریل شسته شده و در زیر دستگاه لامینارفلو به‌مدت بیست دقیقه در محلول دو درصد هیپوکلریدسدیم حاوی چند قطره توین بیست و مواد آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. به‌منظور حذف مواد فنلی از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. سپس نمونه‌ها سه مرحله و در هر مرحله به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شد. پس از مراحل سترون‌سازی در شرایط استریل، نمونه‌ها داخل ظروف شیشه مربایی که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه DKW، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید، ۱ گرم بر لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP)، ۲ گرم ذغال فعال و ۷ گرم بر لیتر آگار و pH برابر ۵/۷ بود، کشت گردیدند. نمونه‌های کشت شده به‌مدت یک هفته در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند و پس از آن به فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. به‌منظور کاهش میزان مواد فنلی، نمونه‌ها هر هفته یکبار در محیط‌کشت مشابه واکشت شدند.

پس از مرحله استقرار، به‌منظور پرآوری و ریزازدیادی گیاه از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی به‌صورت مجزا و در سه تکرار استفاده شد. بدین‌منظور مواد تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینو پورین در پنج سطح مختلف (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک‌اسید به‌عنوان فاکتور اول و آدنین‌سولفات در پنج سطح مختلف (صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر) به‌عنوان فاکتور دوم مد نظر قرار گرفت. محیط‌کشت پایه DKW فاقد هر گونه مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از دو ماه شاخص‌های رشدی شامل صفات وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه در هر گیاهچه، در محیط کشت‌های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

داده‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱)، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات اثر بسیار معنی داری در سطح احتمال یک درصد بر وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه نشان دادند. همچنین اثر متقابل تیمار بنزیل‌آمینوپورین در آدنین‌سولفات نیز بر وزن گیاهچه و طول ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید اما اثر متقابل تیمار بنزیل‌آمینوپورین در آدنین‌سولفات بر تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه معنی‌داری نشد.

بیشترین وزن گیاهچه (۵۷/۶۷ میلی‌گرم) در تیمار با ماده تنظیم کننده رشدی حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۸۰ میلی گرم بر لیترآدنین سولفات مشاهده شد که به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار گرفت. پس از آن، به تیمار حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین در ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات بیشترین وزن گیاهچه را تولید کردند که در گروه دوم و جداگانه از سایر تیمارها قرار گرفت. کمترین وزن گیاهچه (صفر میلی‌گرم) در تیمار فاقد بنزیل آمینوپورین و آدنین‌سولفات ایجاد گردید که به تنهایی در گروه آخر قرار گرفت (جدول ۲).

با نتایج حاصله و بر اساس شکل ۱ مشخص شد که با افزایش سطوح مواد تنظیم‌کننده رشده بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات، وزن گیاهچه افزایش یافته است (شکل ۲). اثرات مثبت افزایش سطوح مواد تنظیم‌کننده رشد در افزایش وزن گیاهچه به‌طور قطع ناشی از تأثیر مستقیم این مواد بر افزایش سرعت جذب و بکارگیری مواد غذایی و تأثیر مستقیم آن بر فرآیند فتوسنتز می‌باشد. این نتایج با پژوهش افلاکی و همکاران (Aflaki *et al.*, 2017) و نیز سعادت و هنرتی (Saadat & Henertty, 2002) با اثرات غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین و ساکارز و تأثیر مثبت آن‌ها در غلظت‌های بالاتر بر افزایش وزن گیاهچه همسو می‌باشد.

بیشترین طول گیاهچه (۷۰ میلی‌متر) در تیمار ماده تنظیم‌کننده رشدی حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات و کمترین طول گیاهچه (صفر میلی‌متر) در تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات ایجاد شد (جدول ۲ و شکل ۳).

با بررسی اثرات متقابل ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپیورین و آدنین‌سولفات (شکل ۳) مشخص شده است که در غلظت‌های پایین ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین، خطوط نمودار بهم نزدیک‌تر هستند و با افزایش غلظت ماده تنظیم‌کننده رشدی، فاصله خطوط بیشتر شده و طول گیاه به‌صورت قابل توجهی افزایش می‌یابد. بوسلا و میکلر (Bosela & Michler, 2008) در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه (*Juglans nigra*) دریافتند که هر سه ماده بنزیل‌آدنین، تیدیازرون (TDZ) و زآتین (ZEA) بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها را فقط در غلظت ۵/۵–۱۲ میکرومولار بنزیل‌آدنین و غلظت ۵ –۲۵ میکرومولار زآتین مشاهده نمودند. همچنین به برتری زآتین نسبت به بنزیل‌آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره نمودند اما بیان نمودند که این تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین اتفاق افتاده و در غلظت‌های بالاتر، باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است که با نتایج حاصل از این آزمایش مغایرت دارد. کیپنیک و کلاقاضی (Kepenek & Kolagasi, 2016) در ریزازدیادی گردو، بیشترین درصد باززایی، بلندترین طول ساقه و بیشترین درصد رشد را در محیط‌کشت NGE دارای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون همراه با ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتریک‌اسید به‌دست آوردند. مدینا و همکاران (Medina *et al.*, 2011) بهترین و بیشترین رشد جوانه انتهایی را در ریزازدیادی گردوی ونزوئلایی در محیط حاوی ۰/۳، ۱/۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۲۳ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آوردند.

مقایسه میانگین تعداد برگ در گیاهچه و در سطوح مختلف ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که بیشترین تعداد برگ (۳/۸۷ عدد) در مقدار دو میلی‌گرم بر لیتربنزیل‌آمینو پورین حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین نداشت اما با تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین (۱/۲۹ عدد) اختلاف معنی‌دار نشان داد. همچنین با مقایسه میانگین تعداد برگ در گیاهچه در سطوح مختلف آدنین‌سولفات مشخص شد که از پنج سطح مورد بررسی، چهار سطح تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند اما تفاوت آنها با سطح فاقد آدنین‌سولفات معنی‌دار شد. بیشترین تعداد برگ (۳/۴ عدد) مربوط به تیمار پنجم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات) و کمترین تعداد برگ (۱/۹ عدد) مربوط به تیمار اول (صفر میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات) بود (شکل ۴ a و b).

مقایسه میانگین تعداد جوانه در گیاهچه با سطوح مختلف ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که سطوح مورد بررسی در چهار گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین تعداد جوانه (۴/۵۳ عدد) مربوط به سطح پنجم ماده تنظیم‌کننده رشدی (دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین) بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار چهارم نداشت اما تفاوت آنها با سایر سطوح بنزیل‌آمینوپورین معنی‌دار بود و کمترین تعداد جوانه (۱/۶۴ عدد) مربوط به تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین بود (شکل ۵ a).

مقایسه میانگین تعداد جوانه در گیاهچه با سطوح مختلف آدنین سولفات نشان داد که از پنج سطح مورد بررسی، چهار سطح تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند اما تفاوت آن‌ها با سطح فاقد آدنین‌سولفات معنی‌دار بود. بیشترین تعداد جوانه (۴/۳۳ عدد) مربوط به تیمار پنجم

(۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات) و کمترین تعداد جوانه (۲/۵۷ عدد) مربوط به تیمار اول (صفر میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات) بود (شکل ۵ b).

نقش سایتوکینین‌ها در گیاهان به‌عنوان محرک تقسیم سلولی، ممانعت از پیری برگ‌ها و جلوگیری از تخریب کلروپلاست و تحریک سنتز کلروفیل محرز شده است، که نتیجه آن می‌تواند با افزایش تعداد جوانه در گیاهچه، تعداد برگ و نهایتا وزن تر گیاهچه همراه باشد. در این پژوهش اثرات مثبت غلظت‌های بالاتر از هر دو تنظیم‌کننده رشد بر افزایش تعداد جوانه و عدم تفاوت معنی‌دار بین دو غلظت بالا، مؤید این موضوع می‌باشد که استفاده از سطوح بالا در زمانی‌که از آستانه اقتصادی تجاوز نکند، قابل توجیه بوده و در غلظت‌های بیش از حد و غیر متعارف نه تنها اثربخشی مثبتی حاصل نمی‌شود بلکه می‌تواند هزینه بیشتری به برنامه کشت بافت گردو تحمیل نماید. یاری و همکاران (Yari *et al*., 2014) بیشترین درصد تعداد جوانه، بیشترین تعداد جوانه حاوی کالوس و بلندترین طول جوانه و همچنین بیشترین وزن تر در هر گیاهچه را در مقدار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون و بنزیل‌آدنین به‌دست آوردند.

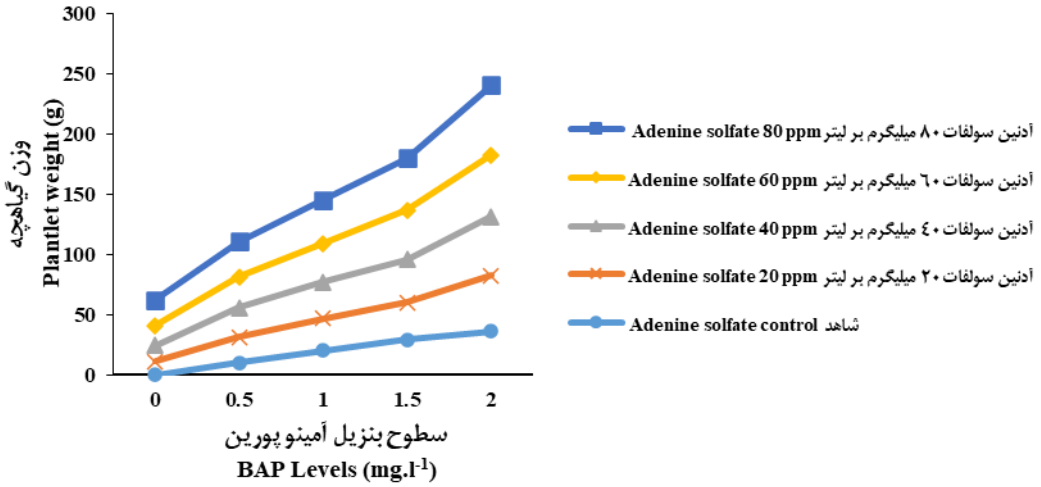
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی گیاهچه و صفات رشد گردو رقم 'چندلر'

Table 1- ANOVA for the effect of plant growth regulators on plantlet regeneration and growth traits of walnut cultivar 'Chandler'

منابع تغییرات Source of varitions	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات Means squares				
		وزن گیاهچه Plantlet weight	طول ساقه Stem length	تعداد برگ Leaf number	تعداد جوانه Bub number	تعداد برگچه Leaflet number
بنزیل‌آمینوپورین BAP (B)	4	1893.73**	1395.54**	14.61**	19.44**	487.96**
آدنین‌سولفات Adenine Sulfate (AS)	4	654.01**	2111.77**	5.86**	7.99**	198.89**
B× AS	16	28.72**	53.55**	0.15ns	0.41ns	198.89ns
خطا Error	50	7.44	9.29	0.53	0.59	7.55
ضریب تغییرات C.V (%)		9.16	7.95	25.55	21.28	18.35

ns، * و **: به‌ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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



شکل ۱- اثر متقابل سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین × آدنین‌سولفات بر وزن گیاهچه گردو رقم 'چندلر' ۸ هفته پس از کشت

Figure 1- The interaction effect of thedifferent levels of BAP ×adenine sulfate on the plantlet weight of walnut cultivar 'Chandler' 8 weeks after cultivation (DMRT, *p≤0.05*)

۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP
1 mg/L BAP

۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP
0.5 mg/L BAP

۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP
2 mg/L BAP

۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP
1.5 mg/L BAP

شکل ۲- رشد گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین ۸ هفته پس از کشت

Figure 2- The growth of walnut plantlets cultivar 'Chandler' in different benzyl aminopurine levels in 8 weeks after cultivation

مقایسه میانگین تعداد برگچه در گیاهچه در سطوح مختلف ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که پنج سطح مورد بررسی در گروه‌های کاملا متفاوت از همدیگر قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه (۲۱/۴۷ عدد) مربوط به سطح پنجم (دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین) و کمترین تعداد برگچه (۲/۵۷ عدد) مربوط به تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین بود (شکل ۶ a). در مقایسه میانگین تعداد برگچه در گیاهچه با سطوح مختلف آدنین‌سولفات مشخص شد که پنج سطح مورد بررسی در سه گروه متفاوت قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه (۱۹/۸۷ عدد) مربوط به سطح پنجم (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات) و کمترین تعداد برگچه (۱۰/۲۱ عدد) مربوط به تیمار فاقد آدنین‌سولفات بود (شکل ۶ b).

با تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تأثیر مواد رشد گیاهی بر فرآیند فتوسنتز انجام گرفته است، مشخص شده است که کاربرد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف هم در تنظیم فتوسنتز و هم در حرکت فرآورده‌های فتوسنتزی از محل تولید آنها در برگ به مقصد نقش اساسی دارد (Tsonev *et al.*, 1998). غلظت مناسب BAP و آدنین‌سولفات از طریق اثر بر تقسیمات سلولی باعث افزایش سطح برگ شده که نتیجه آن دریافت بیشتر تشعشع نوری و افزایش سرعت فتوسنتز می‌باشد. در این بین به نظر می‌رسد که دو ماده تنظیم‌کننده رشد در غلظت مناسب اثر هم‌دیگر را تشدید کرده و با تأثیر بر سرعت جذب و بکارگیری مواد حاصل از فتوسنتز، منجر به افزایش وزن تر و خشک گیاهچه گردیده‌اند. در این وضعیت با قابلیت انتقال گیاهچه‌های تولیدی به محیط ریشه‌زایی به نوبه خود منجر به کاهش طول دوره تکثیری در گیاهچه‌های حاصل و افزایش راندمان تولید گیاهچه در کشت بافت گردو می‌شود. نتایج مشابهی از تأثیر BAP بر رشد و باززایی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت گردو در

پژوهش‌های پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (Payghamzadeh , &Kazemitabar Paygamzadeh, 2010; 2011) نیز حاصل گردیده است.

هاشمی دهکردی و همکاران (Hashemidehkordi *et al.*, 2020) استفاده همزمان از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات را در پینه‌زایی و اندام‌زایی در گیاه شیپوری گلدانی مؤثر دانسته‌اند. اثرات مفید آدنین‌سولفات در ترکیب با BAP بر پرآوری و رشد گیاهچه‌های سیب‌زمینی در گزارش بویان (Bhuiyan, 2013) نیز به اثبات رسیده است. همچنین استفاده همزمان از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات را در جهت القای اندام‌زایی در محیط‌کشت WPM در ریزازدیادی توس توسط نظری و همکاران (Nazari *et al.*, 2017) و همچنین عرب و همکاران (Arab *et al.*, 2003) توصیه شده است.

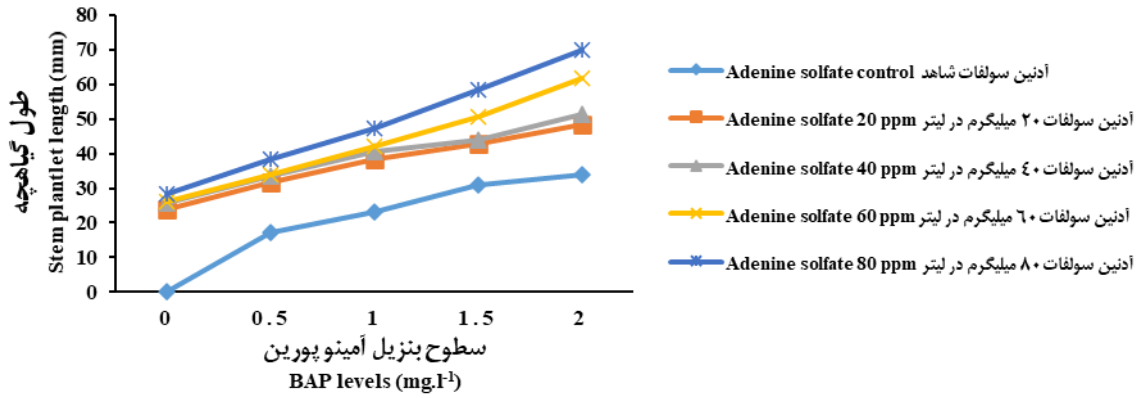
جدول ۲- اثر متقابل بنزیل آمینو پورین × آدنین سولفات بر صفات رشد گیاهچه گردو رقم 'چندلر'

Table 2- The interaction effect of the different levels of benzylaminopurine ×adenine sulfate on the growing traits of walnut plantlets cultivar 'Chandler'

تیمارها Treatments	آدنین سولفات Adenine Sulfat (mg.l^{-1})	بنزیل آمینو پورین BAP (mg.l^{-1})	وزن گیاهچه Plantlet weight (g)	طول ساقه Stem length (cm)	تعداد برگ Leaf number	تعداد جوانه Bub number	تعداد برگچه Leaflet number
1	0	0	0.00 p	0.00 n	0.00 i	0.00 ij	0.00 n
2	20	0	12.00 o	24.33 lm	1.00 hi	1.33 ij	12.00 mn
3	40	0	13.67 o	26.33 j-m	1.33 ghi	1.67 hi	13.67 mn
4	60	0	16.33 no	28.33 jkl	1.67 fgh	2.00 ghi	16.33 lm
5	80	0	27.00 h-k	30.33 lj	2.00 e-h	2.67 e-h	27.00 i-l
6	0	0.5	19.00 mn	22.00 m	1.67 fgh	2.33 f-i	19.00 jkl
7	20	0.5	25.00 jkl	33.67 hi	2.00 e-h	3.33 c-f	25.00 g-k
8	40	0.5	24.33 kl	38.33 fg	2.67 cdef	3.67 b-e	24.33 f-k
9	60	0.5	26.00 i-l	42.67 ef	3.33 bcd	4.33 abc	26.00 e-i
10	80	0.5	29.33 g-j	48.33 cd	3.33 bcd	4.33 abc	29.33 d-h
11	0	1	21.67 lm	24.67 klm	2.00 e-h	2.67 e-h	21.67 kl
12	20	1	26.67 h-k	34.00 ghi	3.00 b-e	3.67 b-e	26.67 f-k
13	40	1	30.00 f-i	40.67 ef	3.33 bcd	4.33 abc	30.00 f-j
14	60	1	32.33 efg	44.00 de	3.33 bcd	4.00 bcd	32.33 d-h
15	80	1	34.33 def	51.33 c	3.33 bcd	4.67 ab	34.33 bcd
16	0	1.5	25.67 i-l	25.67 klm	2.33 d-g	3.00 d-g	25.67 hijk
17	20	1.5	30.67 fgh	35.67 gh	3.33 bcd	4.00 bcd	30.67 c-g
18	40	1.5	36.00 de	41.00 ef	3.67 abc	4.67 ab	36.00 b-e
19	60	1.5	41.00 c	50.67 c	4.00 a	4.67 ab	41.00 c-f
20	80	1.5	40.67 c	61.67 b	3.67 abc	4.65 ab	40.67 bc
21	0	2	33.00 efg	29.00 jk	3.00 b-e	4.00 bcd	33.00 f-j
22	20	2	38.00 cd	38.33 fg	3.67 abc	4.33 abc	38.00 bcd
23	40	2	45.67 b	47.33 cd	4.00 a	3.67 b-e	45.67 bcd
24	60	2	49.00 b	58.33 b	4.00 ab	5.33 a	49.00 b
25	80	2	57.67 a	70.00 a	4.67 a	5.33 a	57.67 a

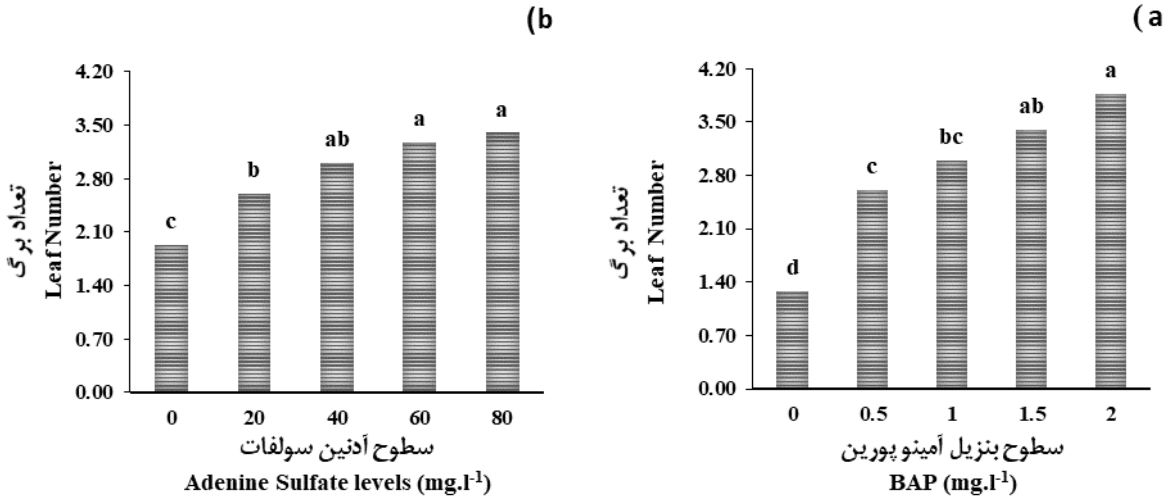
میانگین‌های با حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف نشان ندادند.

Means with common letters did not show differences based on Duncan's multiple range test at the 5% of probability level.



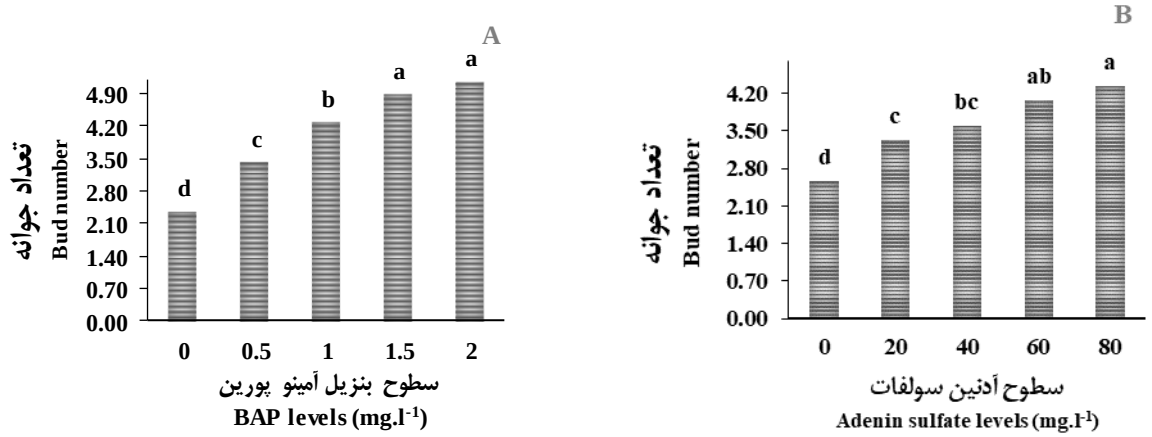
شکل ۳- اثر متقابل بنزیل‌آمینوپورین × آدنین‌سولفات بر طول گیاهچه گردو رقم 'چندلر' ۸ هفته پس از کشت

Figure 3- The interaction effect of the different levels of BAP ×adenine sulfate on the plantlet length of walnut cultivar 'Chandler' 8 weeks after cultivation (DMRT, *p≤0.05*)



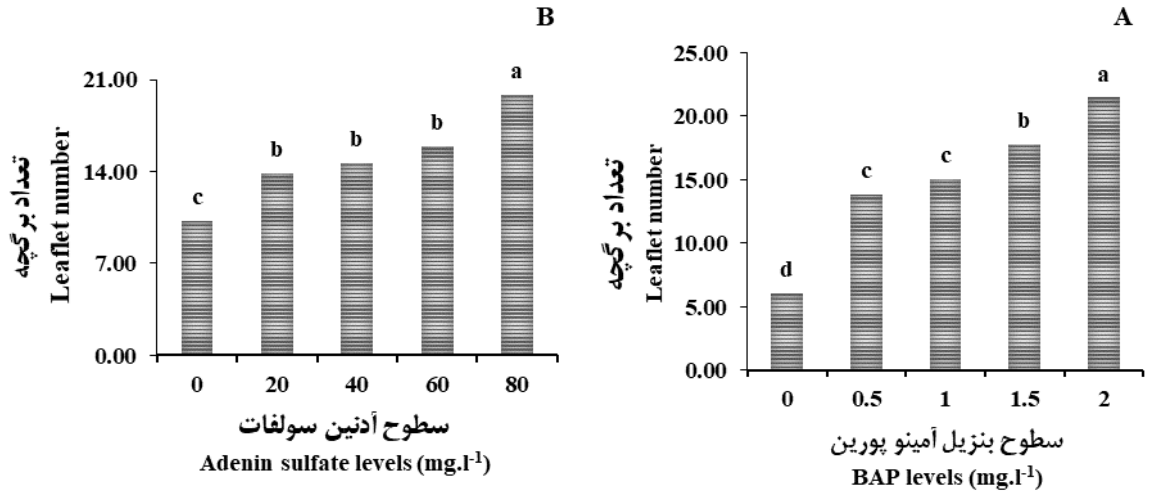
شکل ٤- تعداد برگ در گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین (a) و آدنین‌سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت

Figure 4- The leaf number of walnut cultivar 'Chandler' plantlet with different levels benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation(DMRT, *p≤0.05*)



شکل ٥- تعداد جوانه در گیاهچه گردو رقم 'چندلر در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین (a) و آدنین‌سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت

Figure 5- The bud number of the walnut cultivar 'Chandler'plantlet with different levels of the benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation (DMRT, *p≤0.05*)



شکل ٦- تعداد برگچه در گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین (a) و آدنین‌سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت

Figure 6- The leaflet number in the walnut cultivar 'Chandler' plantlet in different levels of benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation (DMRT, $p \leq 0.05$)

شکل ۷- گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در محیط‌کشت DKW حاوی ٦ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتریک‌اسید

Figure 7- Rooted plantlets ofwalnut cultivar 'Chandler' in DKW medium containing 6 mg.l^{-1} indole butyric acid

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج کلی آزمایش مشخص شد که کاربرد هر دو ماده تنظیم‌کننده رشد مورد مطالعه، باعث افزایش معنی‌دار وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه نسبت به تیمار شاهد شدند. درصد قابل توجهی از رشد گیاهچه‌ها هنگام استفاده از مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی حاصل شد و در صورت عدم استفاده از این مواد، هیچ رشدی در گیاهچه دیده نشد. همه صفات مورد ارزیابی با اضافه شدن مقادیر مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی افزایش قابل توجه داشتند ضمن اینکه بالاترین میزان صفات در گیاهچه‌ها در استفاده همزمان از بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات حاصل گردید.

References

1. Aflaki, M., hatamzadeh, A., & Bahrami Sirmandi, H. (2017). The effect of lignosulfunate on rooting of micropropagated walnut. *Journal of Horticultural Science*, *31*(2), 327-337. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.52658
2- Amiri, M.E., & Gharati, S. (2012). Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(8), 1482-1485. https://doi.org/10.5897/JMPR11.1491
3- Anonymous. (2020). Agricultural statistics. The first volume: Crops. Ministry of Agricultural Jihad, Planning and Economic Deputy. Information and Communication Technology Center. 125 p. (In Persian)
4- Arab, R., Jafari mofid abadi, A., Majd, A., & Dehghan-Shoreki, Y. (2003). In vitro proliferation of date palm (*Phoneix dactylifera* L. cv. Mazafeti) plantlet derived from embryo culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *11*(2), 171-180. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2003.115495
5- Bhuiyan, F.R. (2013). In vitro meristem culture and regeneration of three potato varieties of Bangladesh. *Research of. Biotechnolnology*, *4*, 29-37. https://doi.org/journal/index.php/rib/article/view/2432
6- Bosela, M.J., & Michler, C.H. (2008). Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *44*, 316–329. https://doi.org/10.1007/s11627-008-9114-5
7- Driver, J.A., & Kuniyuki, A.H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*) rootstock. *Hort Science*, *19*, 507-509. https://doi.org/10.4236/adr.2022.104033
8- Ehteshamnia, A., & Gholami, M. (2014). Inhibition of Persian walnut (*Juglans regia* L.) micro cuttings browning by utilizing different methods. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* (JBES), *5*(2), 562-571.
9- Hashemidehkordi, E., Mortazavi, S.N., & Azadi, P. (2020). Callus production and organogenesis in pot calla lily (*Zantedeschia* spp. cv. Orania). *FOP*, *5*(1), 13-18. https://flowerjournal.ir/article-1-167-fa.html
10- Kaur, R., Sharma, N., Kumar, K., Sharma, D.R., & Sharma, S.D. (2006). *In vitro* germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. *Scientia Horticult*, *109*, 385-388. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.05.012
11- Kepenek, K., & Kolagasi, Z. (2016). Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica*, *130*(1), 150-156. https://doi.org/10.12693/APhysPolA.130.150
12- Mohammadinejad, S., Gholami, M., & Ezni Ashari, M. (2013). The effect of culture media and cytokinin on the primary steps of walnut micro propagation, selected genotype. *Plant Production*, *37*(3), 83-92. (In Persian with English abstract)
13- Nazari, J., Payam noor, V., Alizadeh, M., & Ghasemi Bezdi, K. (2017). Micropropagation of birch (*Betula litwinowii*) from leaf callus. *Forest and Wood Products*, *70*(2), 199-207. https://doi.org/10.22059/jfwp.2017.62477
14- McGranahan, G.H., & Leslie, C.A. (1988). In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. *Hort Science*, *23*, 220.
15- McGranahan, G.H., Tuleke, W., Arulsekar, S., & Hansen, J.J. (1986). Intergeneric hybridization in the Juglandaceae: *Pterocarya* sp. x *Juglans regia*. *Journal of American Society Horticultural Science*, *111*, 627-630. https://doi.org/10.1007/BF00269923
16- Medina, A., Betancourt, M., & Ortiz, R. (2011). Initial development of *in vitro* propagation protocols for Caracas walnut *Juglans venezuelensis*, a critically endangered tree endemic to El Ávila National Park, northern *Venezuela*. *Conservation Evidence*, *8*, 26-30. www.ConservationEvidence.com
17- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S.K. (2010). The effects of BAP and IBA and genotypes on *in vitro* germination of immature walnut embryos. *International Journal of Plant Products*, *4*(4), 309-322. https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.714
18- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S.K. (2011). *In vitro* propagation of walnut - A review. *African Journal of Biotechnology*, *10*(3), 290-311.
18- Rodriguez, R. (1982). Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledons. *Horticulture Science*, *17*, 195–196. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00003-1
19- Saadat, Y.A., & Hennerty, M.J. (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Hortticulturae*, *95*, 251–260.
20- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G., & Popova, L.P. (1998). A possible role for Jasmonic acidin adaptation of barley seedling to salinity stress. *Plant Growth Regulation*, *17*, 153-159. https://doi.org/10.1007/PL00007029
21- Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z., & McGranahan, G.H. (2004). Rooting and acclimatization of *in vitro* grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivar. *Hortscience*, *39*(2), 324–327. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.2.324

22- Vahdati, K., Najafian Ashrafi, E., Ebrahimzadeh, H., & Mirmasoumi, M. (2008). Improved micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.) on media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. *Acta Horticulturae*, 839. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.13

23- Yari, M., Gholami, M., Esna-Ashari, M., & Kheradmand, H. (2014). Effect of season and explant type on *in vitro* propagation of *Juglans regia* L. genotypes Z60 and Z63. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *7*(9), 624-629.

24- Vahdati, K. (2005). *Nursery management and grafting of walnut*. Khaniran Publications, 113 pp.

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 577-597

Characterization of Melon Resistant Cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Based on Morphological Traits and R Gene Patterns

F. Shokouhifar[1]*, M. Mamarabadi[2], S. Toosi[3]

1 and 2- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: shokouhifar@um.ac.ir)
3- Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashahad, Iran

Received: 27-01-2024
Revised: 19-05-2024
Accepted: 16-06-2024
Available Online: 18-06-2024

How to cite this article:
Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Toosi, S. (2024). Characterization of melon resistant cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* based on morphological traits and R gene patterns. *Journal of Horticultural Science, 38*(3), 577-597. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86574.1324

Introduction

Melon (*Cucumis melo* L.) is a diploid plant with (2n = 2x = 24) chromosomes, dicotyledonous and annual, which has been receiving lots of attention for its biological characteristics and economic value for a long time. Iran with production of about 1.6 million tons per year ranks third in melon production in the world after China and Turkey. Vascular wilt caused by the soil borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* is one of the most important diseases causing damage to the melon plant. Due to the survival of this fungus in the form of chlamydospores in the soil and plant debris its control has been a difficult challenge so that, the only way to deal with this disease is to use resistant cultivars. The present study was conducted to characterize morphologically different melon cultivars with varying levels of resistance against Fusarium vascular wilt. Furthermore, the presence pattern of two MRGH genes belonging to the MRGH21 linkage group was tracked in the genome of the melon line, and their variations were defined. Moreover, the potential for using these genes in gene-assisted selection was investigated.

Materials and Methods

Five different varieties of melon named Charentais T, Charentais Fom1, Charentais Fom2, BG-5384 and the local cultivar Khatouni were grown under greenhouse conditions. Different characteristics of the plant, including leaf shape, male flowers, female flowers and normal flowers, and after harvesting the fruits, fruit weight, fruit diameter and length, diameter of flesh and middle cavity. The differentiation of resistant and sensitive cultivars was investigated based on the evaluated morphological traits. Additionally, the presence patterns of resistance genes were examined in the genomic data of the aforementioned melon cultivars. The genomic analysis of melons aimed to locate the MRGH21 linkage group, which carries several resistance genes. The sequence of this linkage group was tracked from two gene bank databases in NCBI and MELONOMICS database.

Results

Based on the obtained results, although it was possible to differentiate melon cultivars based on morphological traits, but since the study of these traits in the evaluation of a large number of samples in selective studies is a very time-consuming and costly task. Therefore, the presence pattern of resistance genes were analyzed in the genomic data of different melon cultivars. The sequence between two genes *MRGH12* and *MRGH13* including *MRGH21* linkage group as one of the linkage groups carrying a number of resistance genes on Ch09 chromosome was retrieved form two gene bank databases in NCBI and MELONOMICS. Due to the presence of multiple point mutations in the genomic data, the MRGH13 gene sequence was selected for investigation in melon cultivars. Specific primers, PSh21-F/R, were designed to track part of this gene's sequence. The tracking results showed that a

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86574.1324

single specific band, corresponding to the expected size, could be detected in the cultivars Charentais Fom1 and BG-5384. Sequence analysis using the InterPro network tool confirmed the possible role of the protein coded by the MRGH13 gene. It was identified as a member of the protein family carrying leucine-rich repeat sequences, including the TIR, NB-ARC, and LRR domains.

Discussion

Attaining suitable markers to distinguish melon cultivars resistant to Fusarium wilt disease can support the development of breeding programs with higher accuracy and speed. The results of the present study showed that based on the morphological traits such as leaf shape, the presence of full flowers, and the number of petals, some differences can be observed between different melon cultivars, but the noteworthy point is that in selection programs searching for these morphological traits will be a very time-consuming and expensive task due to the large number of investigated samples. Therefore, if molecular markers related to the resistance trait are available, the efficiency of breeding programs is expected to increase significantly. In the present study *MRGH13* gene was selected to be investigated for tracking in melon cultivars and specific primers were designed to track part of the sequence of this gene. The tracking results showed that a single specific band could be detected in the cultivars Charentais Fom1 and BG-5384. Biological processes related to MRGH13 protein in the QuickGO network tool showed its relevance in the signaling pathway that regulates immune responses. In future studies, it is suggested to evaluate the ability to distinguish resistant cultivars based on resistance genes, including the *MRGH13* gene, in a larger number of samples. Moreover, considering to the predicted functions of MRGH13 protein, more investigation on its interaction with other resistance proteins as well as proteins of pathogenic agents can be useful for identification of its functional role in resistance.

Keywords: Fusarium wilt disease of melon, Marker assisted selection, Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS–LRR) Genes, Plant disease resistance genes

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۷۷-۵۹۷

تمایز ارقام مقاوم ملون در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* بر اساس صفات ظاهری و الگوی حضور ژن‌های مقاومت

فرهاد شکوهی فر[۱]*- مجتبی ممرآبادی[۲]- صهبا طوسی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

چکیده

دست‌یابی به نشانگرهای مرتبط به صفت مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی ملون می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی مؤثر باشد. بدین منظور تعدادی از ارقام استاندارد ملون شامل 'Charentais T'، 'Charentais Fom1'، 'Charentais Fom2' و 'BG-5384' با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*، و یک رقم محلی به نام'خاتونی'، از نظر صفات ظاهری گیاه و همچنین الگوی حضور ژن‌های مقاومت در برابر بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده هر چند امکان تمایز ارقام بر اساس صفات ظاهری ممکن بود ولی از آنجا که مطالعه این صفات در ارزیابی تعداد زیاد نمونه‌ها در مطالعات گزینشی کاری بسیار زمان‌بر و هزینه‌بر است، الگوی حضور ژن های مقاومت در داده‌های ژنومی این ارقام مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای داده‌های ژنومی ملون با هدف مکان‌یابی موقعیت گروه لینکاژی *MRGH21* به‌عنوان یکی از گروه‌های لینکاژی حامل تعدادی از ژن‌های مقاومت انجام شد. توالی این گروه لینکاژی از دو پایگاه بانک ژن در NCBI و پایگاه MELONOMICS ردیابی شد و توالی حدفاصل دو ژن *MRGH12* (MELO3C022143.2.1) و *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) در برگیرنده این گروه لینکاژی روی کروموزوم شماره Ch09 استحصال شد. وجود جهش‌های نقطه‌ای متعدد در داده های ژنومی سبب شد تا توالی ژن *MRGH13* جهت ردیابی در ارقام ملون مورد بررسی قرار گیرد. آغازگرهای اختصاصی PSh21-F/R برای ردیابی بخشی از توالی این ژن طراحی شد. نتایج ردیابی نشان داد تک باند اختصاصی در ارقام 'Charentais Fom1' و 'BG-5384' منطبق با اندازه مورد انتظار قابل ردیابی است. نقش احتمالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* با آنالیز توالی آن در ابزار تحت شبکه InterPro این پروتئین را به عنوان یک عضو خانواده پروتئین‌های حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین تایید نمود و موقعیت دمین‌های TIR، NB-ARC و LRR را مشخص نمود. فرآیندهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13 در ابزار تحت شبکه QuickGO ارتباط آن را در مسیر پیام‌رسانی تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی نشان داد. در مطالعات آتی ارزیابی قابلیت تمایز ارقام مقاوم براساس ژن‌های مقاومت از جمله ژن *MRGH13* در تعداد بیشتری از نمونه‌ها مورد بررسی پیشنهاد می‌گردد. همچنین با توجه به کارکردهای پیش‌بینی‌شده برای پروتئین MRGH13 بررسی نحوه برهمکنش آن با دیگر پروتئین‌های مقاومت و همچنین پروتئین‌های عوامل بیماری‌زا می‌تواند در شناسایی نقش کارکردی آن در مقاومت مفید باشد.

واژه‌های کلیدی بیماری پژمردگی فوزاریومی ملون، ژن‌های مقاومت حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین، داده‌های ژنومی ملون، گزینش مبتنی بر صفات مرتبط با مقاومت

مقدمه

ملون (*Cucumis melo* L.) گیاهی دیپلویید با (2n = 2x = 24) کروموزوم، دولپه و یکساله می‌باشد که به خاطر ویژگی‌های بیولوژیکی و ارزش اقتصادی از دیرباز مورد توجه قرار گرفته است. خاستگاه این گیاه به احتمال زیاد شرق آفریقا بوده است ولی برخی خاستگاه این گیاه را آسیا می‌دانند (Pitrat, 2008). گیاه ملون به همراه گیاهانی چون خیار، هندوانه و کدو متعلق به خانواده کدوییان یا Cucurbitaceae می‌باشد (Garcia-Mas *et al.*, 2012). این

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: shokouhifar@um.ac.ir)
۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86574.1324

گیاهان دارای بتا کاروتن بالا، ویتامین‌های A و C، پتاسیم، آب فراوان و ارزش گرمایی پایین هستند (Teimouri *et al.*, 2013). بر اساس آمار سازمان فائو تولید جهانی گیاه ملون در سال ۲۰۱۷ حدود ۳۲ میلیون تن بوده که از این میان کشور چین با تولید ۱۷ میلیون تن بیشترین تولید را داشته و پس از آن کشورهای ترکیه با تولید ۱/۸ میلیون تن و ایران با تولید حدود ۱/۶ میلیون تن در رتبه دوم و سوم قرار گرفته‌اند (FAO, 2017).

یکی از بیماری‌های خسارت‌زا به گیاه ملون توسط قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ایجاد می‌شود و سبب پوسیدگی آوندی گیاهچه‌ها می شود. این قارچ اولین بار در سال ۱۹۳۰ در نیویورک گزارش شد (Chupp, 1930) و در حال حاضر در بسیاری از کشورها نیز گزارش شده است (Leary *et* Leach, 1933 , Quiot *et al.*, 1979; *al.*, 1976). علائم ظاهری بیماری شامل پژمردگی ساقه و اندام‌های هوایی است که در بافت آوندی در منطقه طوقه گیاه خسارت وارد می‌نماید و همچنین سبب تغییر رنگ ریشه‌ها می شود (Chilosi *et al.*, 2008). دامنه تخریب این قارچ در عملکرد و کیفیت گیاه در برخی مطالعات به حدود ۱۰۰ درصد تولید محصول رسیده است (Benoit, 1974). قارچ فوزاریوم در مناطق معتدل و گرمسیری شیوع داشته و برای مدت‌های طولانی به‌صورت کلامیدوسپور در بقایای گیاهی و ریشه گیاهانی که در تناوب با ملون هستند در خاک بقاء می‌یابد (Kantoğlu *et al.*, 2010). بقای این قارچ به‌صورت کلامیدوسپور در خاک و بقایای گیاهی برای مدت‌های طولانی مبارزه با آن را به چالشی سخت بدل کرده است به‌طوری‌که تنها راه مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد (Kantoğlu *et al.*, 2010).

توصیف ارقام ملون با مقایسه صفات کمی و کیفی مورد توجه بوده است (Chikh-Rouhou *et al.*, Ajuru & Okoli, 2013 , Soltani *et al.*, 2022; Szamosi *et al.*, 2010;2010,). از جمله صفات مورد بررسی می توان به مقایسه ویژگی‌های ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر اشاره نمود که در گیاهان بالغ کشت شده در مزرعه ارزیابی شده‌اند (Ajuru & Okoli, 2013). صفات برخی از ارقام منشاء گرفته از توده‌های بومی نیز مورد مطالعه قرار گفته است (Sobhani *et al.*, 2015). بطور معمول تمایز ارقام ملون بر اساس صفات رشدی، زایشی و ویژگی‌های میوه انجام می‌شود که با محدودیت‌های زمانی و محیطی همراه است. استفاده از صفات مورفولوژیکی و مولکولی در تمایز ارقام ملون در چند تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است. در یک مطالعه، ۵۴ رقم ملون با ژنوتیپ‌های مختلف از ۲۳ کشور از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک (مراحل رشد رویشی، گلدهی و میوه رسیده) و ویژگی‌های کیفی (مزه، عطر، ترکیب شکر و pH) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه همچنین با مطالعه چندشکلی DNA با استفاده از روش‌های Inter-SSR-PCR و RAPD، چند شکلی‌های DNA فراوانی در بین ژنوتیپ‌های ملون یافت شد (Stepansky *et al.*, 1999). در تحقیق دیگری، تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در طی رشد، بلوغ و رسیدگی ۷ رقم ملون مورد بررسی قرار گرفت. همچنین رابطه بین تولید CO_2 و C_2H_4 و دیگر علائم رسیدن مورد مطالعه قرار گرفت (Miccolis & Saltveit, 1991). در یک مطالعه دیگر ۵۸ رقم ملون از نظر ویژگی های مورفولوژیکی ژرم‌پلاسم ملون ترکیه‌ای و مجارستانی را مورد مقایسه قرار داد. نتایج نشان داد که هر دو ژرم‌پلاسم ترکیه‌ای و مجارستانی از نظر خصوصیات مورفولوژیکی تنوع زیادی نشان می دهند. همچنین نتایج حاکی از تفاوت ارقام دو کشور از نظر صفات کمی و کیفی بود (Szamosi *et al.*, 2010). در مطالعه دیگری با استفاده از تعداد هجده SSR یا میکروساتلایت، تنوع ژنتیکی در کلکسیونی از ۲۷ واریته ملون شامل محدوده وسیعی از ارقام وحشی و زراعی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این تحقیق با روش تجزیه کلاستر، ۵ گروه شناسایی شدند. دو گروه عمده شامل ارقام مدیترانه-ای، و ارقامی هم از چین، ژاپن، کره و هند بودند. هر دو گروه سطح کمی از تنوع داخل رقمی را نسبت به گروه‌های دیگر نشان می‌دادند که بیانگر وقوع فرسایشی در تنوع ژنتیکی آنها بود. این امر احتمالا بخاطر رانش یا اصلاح درون گروهی بوده است. گروه‌های دیگر عمدتا از آفریقای مرکزی و هند متنوع‌تر بوده و پیشنهاد شده که به‌عنوان منابع تغییرات ژنتیکی در اصلاح ملون مورد استفاده قرار گیرند (Monforte *et al.*, 2003).

روش‌های گزینش مبتنی بر نشانگرهای مولکولی گزینش منابع مقاومت را بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی و ژنومی ممکن ساخته‌اند (Sudheesh *et al.*, 2021). با توجه به شناسایی ژن‌های مرتبط با بسیاری از صفات ظاهری، گزینش برای انتخاب صفات مناسب با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط مورد توجه قرار گرفته است (Lian *et al.*, 2021). گزارش ژن‌ها و جهش‌های نقطه‌ای کارکردی مرتبط با بیماری‌ها شناسایی و ردیابی آلل‌های مقاومت را در نمونه-های ژرم‌پلاسمی ممکن ساخته‌است (Deokar *et al.*, 2019 , Udoh *et al.*, 2021;Singh *et al.*, 2023).

در ژنوم ملون بالغ بر چهارصد ژن با ساختاری مشابه با ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها شناسایی شده است (Garcia-Mas *et al.*, 2012). از این میان تعدادی از ژن‌ها، در مقاومت به بیماری فوزاریوم نقش دارند. حضور ژن‌های مقاومت در ارقام مختلف می‌تواند مبنای طبقه‌بندی نژادهای قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* قرار گرفته است. در ارقام ملون دو ژن مقاومت مستقل و غالب (*Fom-1* و *Fom-2*) گزارش شده‌است که ژن *Fom-1* مسئول

مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲؛ و ژن *Fom-2* در برابر نژادهای صفر و ۲ این قارچ مقاومت ایجاد می‌کند (Zink & Thomas, 1990; Zheng & Wolff, 2000). یک ژن منفرد و غالب دیگر به نام *Fom-3* در رقم Perlita-FR گزارش شده است که می‌تواند عامل مقاومت نژادهای صفر و ۲ باشد (Zink, 1985). نژاد صفر، بیماری را تنها در ژنوتیپ‌هایی از ملون ایجاد می‌کند که فاقد هر ژن مقاومت دیگری به این بیماری باشند (Zink & Thomas, 1990). تاکنون ژن‌های مقاومت *Fom-1* (Brotman *et al.*, 2013) و *Fom-2* (Joobeur *et al.*, 2004) همسانه‌سازی شده‌اند.

هر چند در گزارش‌های اولیه ۷ نژاد در جمعیت این بیمارگر گزارش شده است (Armstrong & Armstrong, 1978) ولی در مطالعات تکمیلی صرفا بر مبنای ژن‌های مقاومت شناسایی شده، جمعیت قارچ فوزاریوم عامل بیماری پژمردگی آوندی ملون در چهار نژاد با نام‌های صفر، ۱، ۲ و ۱/۲ تقسیم بندی شده‌اند (Risser & DW, 1976). در مطالعات بعدی نژاد ۱/۲ به دو زیرنژاد ۱/۲y و ۱/۲w به‌ترتیب با بروز علایم زردی و پژمردگی از یکدیگر تفکیک شدند (Herman & Perl-Treves, 2007). در مطالعات معمولا چهار رقم استاندارد شامل ‘Charentais T’، ‘Charentais Fom1’، ‘Charentais Fom2’ و ‘BG-5384’ با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*، مربوط به دسته کانتالوپنسیس برای تمایز نژادهای مورد استفاده قرار می‌گیرند. رقم فرانسوی ‘Charentais Fom1’ در برابر نژادهای صفر و ۲ قارچ فوزاریوم مقاوم می باشد. ‘Charentais Fom2’ در برابر نژادهای صفر و ۱ مقاوم بوده و به همراه رقم ‘Charentais T’ از کشور فرانسه منشا گرفته است. رقم ‘Charentais T’ به هر سه نژاد صفر، ۱ و ۲ حساس می‌باشد (Chikh-RouhouAlvarez *et al.*, 2005, Oumouloud *et al.*, 2013*et al.*, 2008). هر سه رقم فوق از واریته کانتالوپ ملون اصلاح شده‌اند. رقم پرتغالی ‘BG-5384’ که از واریته کانتالوپ منشاء گرفته سطح نسبتا بالایی از مقاومت را به نژاد ۱/۲ قارچ فوزاریوم نشان داده‌است. همچنین سطوحی از مقاومت به نژادهای کمتر مهاجم همین قارچ در برخی از ارقام منشاء گرفته از واریته Inodorus مشاهده شده است (Chikh-Rouhou *et al.*, 2007;2010, Chikh-Rouhou *et al.*). ژن‌های مقاومت می‌توانند هدف مناسبی برای ردیابی با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی و گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم در نسل‌های تفکیک مورد توجه قرار گیرند (Jiang, 2013). در مطالعه انجام‌شده روی توالی ژن *Fom-2* در ارقام مختلف ملون جهش‌های همنام و غیرهمنام گزارش شده است، ولی این تنوع به‌عنوان یک جهش کارکردی متمایزکننده نتوانسته است روش سریع و ساده‌ای را برای تمایز ژنوتیپ‌های ملون مقاوم و حساس به بیماری فوزاریوم معرفی نماید (Shokouhifar *et al.*, 2016). بررسی تعداد گسترده‌تری از ژن‌های مقاومت می‌تواند شانس دست‌یابی به جهش‌های کارکردی را افزایش دهد.

علاوه بر ژن‌های مقاومت شناخته شده در ارقام مقاوم به بیماری فوزاریوم، ژنوم گیاهان دارای تعداد زیادی ژن مقاومت (R genes) برای مقابله با عوامل بیمارگر می‌باشد. عمده این ژن‌های مقاومت به خانواده بزرگی از ژن‌ها (۱۵۰–۶۰۰ عضو) تعلق دارند که پروتئین‌هایی را با یک مکان اتصال نوکلئوتیدی (NBS) و یک دمین تکرار غنی از لوسین (LRR) کد می‌کنند (دسته NBS-LRR) (van Leeuwen *et al.*, 2005). همولوگ‌های ژن مقاومت (RGHs) دسته NBS-LRR در ژنوم گیاهان مختلف پیدا شده‌اند. این دسته از ژن‌های مقاومت به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول که در دمین پایانه N آنها یک گیرنده Toll/Interleukin-1 (TIR) وجود دارد و گروه دوم که در این پایانه N آن‌ها یک دمین پیچ در پیچ (CC) قرار دارد. اختصاصی بودن ژن‌های مقاومت برای نژادهای مختلف یک پاتوژن می‌تواند به وسیله دمین‌های TIR (Luck *et al.*, 2000) یا LRR (Van der Hoorn *et al.*, 2001) تعیین شود. در گیاه ملون همولوگ‌های ژن مقاومت گروه LRR اغلب به‌صورت خوشه‌هایی در ژنوم سازمان یافته‌اند. وقایع نوترکیبی که ژن‌های مقاومت جدیدی را می‌سازند و مقاومت را در مقابل پاتوژن‌های مختلف القا می‌کنند عمدتا شامل نوترکیبی بین ژن‌های NBS-LRR از یک خوشه می‌باشند (van Leeuwen *et al.*, 2005Meyers *et al.*, 2003).

بر اساس توالی‌یابی نتاج جمعیت F2 چهار کانتیگ شامل کانتیگ *MRGH21* (با هشت ژن)، کانتیگ *MRGH63* (با سه ژن)، کانتیگ های *MRGH7* و *MRGH18* هر یک با یک ژن، در ملون شناسایی شده‌است (van Leeuwen *et al.*, 2005). تمرکز ژن‌های R و وجود توالی‌های تکرارشونده در این گروه‌های لینکاژی توالی‌یابی کامل را با مشکل روبرو ساخته است و روش‌های خاصی برای توالی یابی این مناطق به‌کارگرفته شده است (González *et al.*, 2014).

با این حال تلاش‌های مداوم و متعددی برای توالی‌یابی ژنوم کامل ملون و تفسیر آن گزارش شده است (Castanera *et al.*, Garcia-Mas *et al.*, 2012, Ruggieri *et al.*, 2018;2020). آخرین نسخه منتشرشده آن نسخه شماره ۱۰۲ است که از تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲ در ابزار مرورگر ژنومی در پایگاه NCBI با شماره بازیابی GCF_025177605.1 در دسترس قرار گرفته است. همچنین بطور موازی داده‌های ژنومی ملون در پایگاه آرشیو نوکلئوتیدی اروپا (ENA) با شماره بازیابی PRJEB34181 از طریق پایگاه داده‌های ملانومیکس (www.melonomics.net) قابل دسترس است.

تکمیل داده‌های ژنومی ملون مکان‌یابی ژن‌های مقاومت را امکان‌پذیر ساخته است. در گروه لینکاژی ژن *MRGH21* نُه ژن حامل دمین‌های کارکردی NBS-LRR قرار گرفته است که دو ژن مقاومت (*Fom-1* و *Prv*) به‌ترتیب مسئول مقاومت به نژادهای صفر و ۲ قارچ *F. oxysporium* f.sp. *melonis* و ویروس Papaya Ring-Spot Virus (PRSV) را نیز شامل می‌شوند. مطالعات نشان داده است بعضی از ژن‌ها در این گروه لینکاژی بیان متمایزی در ارقام ملون مقاوم به بیماری باکتریایی Fruit Blotch (BFB) نشان می دهند (Islam *et al.*, 2020). این گروه لینکاژی روی کروموزوم Chr9 ملون حدفاصل دو ژن *MRGH12* و *MRGH13* قرار گرفته است. جهش‌های نقطه‌ای در توالی این ژن‌ها در مطالعات صورت گرفته روی گونه‌های مختلف ملون گزارش شده است (Morata & Puigdomènech, 2017). همچنین میان ارقام مختلف ملون از نظر الگوی حضور و عدم حضور بعضی از ژن‌های R تفاوت‌هایی مشاهده شده است (González *et al.*, 2014). از این رو ردیابی این ژن‌ها در تعدادی از این واریته‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای حضور ژن *MRGH21* در واریته محلی خربزه ایرانی به نام خاتونی گزارش شده است (Abbaspour & Shokouhifar, 2012b). به‌نظر می‌رسد ردیابی و بررسی توالی این ژن‌ها در واریته‌های مقاوم و حساس، می‌تواند در تمایز و شناسایی جهش‌های مرتبط با مقاومت به بیماری فوزاریوم در ملون مورد توجه قرار گیرد.

مطالعه حاضر با هدف توصیف ارقام مقاوم ملون، دارای سطح مقاومتی مختلف در برابر قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی انجام شد. در این مطالعه توصیف صفات ظاهری ارقام ملون با سطوح مقاومتی مختلف و ردیابی دو ژن *MRGH* از گروه لینکاژی *MRGH21* انجام شد و امکان تعیین ژن‌های مناسب برای انجام گزینش مبتنی بر ژن‌های مقاومت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور پنج رقم افتراقی ملون به نام‌های ‘Charentais T’، ‘Charentais Fom1’، ‘Charentais Fom2’ و ‘BG-5384’ مربوط به دسته cantalupensis (Chikh-Rouhou *et al.*, 2008, Oumouloud *et al.*, 2013) (اهداء شده توسط پروفسور جی. ام. آلوارز از مرکز سیتا از اسپانیا) و رقم محلی ‘خاتونی’ (اهدائی دکتر علی رضا سبحانی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی) نگهداری شده در بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد.

کشت و ارزیابی صفات ظاهری ارقام ملون

ضدعفونی بذور بر اساس روش چنارانی و همکاران (Chenarani *et al.*, 2012) انجام شد. بر این اساس ابتدا پوست بذور حذف شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. آبشویی بذرها سه بار جمعاً به‌مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل و تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار فلو انجام شد. سپس بذور استریل در زیر هود داخل تشتک‌های پتری دارای کاغذ صافی مرطوب استریل قرار داده شده و به‌مدت سه روز در دمای اتاق نگه‌داری شدند. با توجه به محدودیت تعداد بذر در اختیار، از هر رقم تعداد ۵ بذر برای مرحله ضد عفونی و جوانه‌زنی استفاده شد و از میان آن سه بذر جوانه دار شده جهت کشت انتخاب شد. بذور جوانه‌زده به درون گلدان‌های ۷ لیتری با دهانه ۲۲ سانتی‌متری حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۲ اتوکلاو شده و شستشو شده با آب مقطر استریل، کشت شدند. گلدان‌ها در ابتدای فروردین ماه به گلخانه با شرایط دمایی ۱۶ تا ۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت حدود ۶۰ درصد منتقل گردیدند. در طول دوره رشد گیاهان با محلول آبیاری زیستا (شرکت زیست تروند آرین، ایران) تغذیه شدند.

صفات مختلف گیاه از جمله شکل برگ، گل‌های نر، گل‌های ماده و گل‌های نرماده، و پس از چیدن میوه‌ها وزن میوه، قطر و طول میوه، قطر گوشت و حفره میانی، طول و عرض بذور اندازه‌گیری و ثبت شد. در خصوص شکل برگ تعداد لوپ ها و عمق آن‌ها در برگ‌های کاملاً توسعه یافته (پنجمین برگ از انتهال ساقه) بصورت مشاهده‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. در خصوص گل‌ها صرفا به قابلیت تولید انواع گل ها از نظر جنسیت و از نظر تعداد گلبرگ توجه شد (Ajuru & Okoli, 2013). تمایز ارقام مقاوم و حساس بر اساس صفات ظاهری ارزیابی شده مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی‌که توصیف ارقام ملون در تمایز آن‌ها ضروری است، شناسایی صفات متمایزکننده ارقام در انتخاب نتاج حاصل از تلاقی کاربرد خواهد داشت. با توجه به تنوع بالای اندام‌های رویشی و زایشی در زیر گونه‌های ملون در این مطالعه، پنج رقم استاندارد ملون از نظر صفات رویشی و زایشی مورد مقایسه قرار گرفتند. صفات ظاهری هر رقم از سه گیاه و حداقل سه نمونه از هر گیاه یادداشت‌برداری شد. در خصوص صفات کیفی مانند شکل برگ و ویژگی‌های گل‌ها صرفا بصورت مشاهده‌ای داده‌های مورد مقایسه قرار گرفتند. در خصوص صفات کمی مانند میوه و بذر یادداشت‌برداری‌ها در تکرارهای حداقل سه‌تایی انجام شد و برای هر دسته از داده‌ها بطور مستقل معیارهای مرکزی (میانگین) و پراکنش (Error Bar) محاسبه و بصورت جدول ارائه شد.

آنالیز داده‌های ژنومی ملون و مکان‌یابی ژن‌های *MRGH*

توالی ژن‌های *MRGH* بر اساس داده‌های گزارش شده (Oumouloud *et al*., 2015) در توالی ژنومی رفرنس ملون با شماره بازیابی GCF_025177605.1 نسخه annotated شماره ۱۰۲ آزاد شده در تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲ ردیابی شد و توالی در برگیرنده ژن‌های *MRGH12* و *MRGH13* قرار گرفته در گروه‌های پیوسته مرتبط به مقاومت به بیماری‌ها بر اساس گزارش‌های قبلی (Garcia-Mas *et al*., 2001 , van Leeuwen *et al*., 2005 , Abbaspour & Shokouhifar, 2012b) از بانک ژن استحصال شد. همچنین توالی گروه لینکاژی *MRGH21* با ردیابی توالی دو ژن *MRGH12* و *MRGH13* در داده‌های ژنومی ارائه شده در پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics) نیز ردیابی و توالی کامل این گروه لینکاژی استحصال شد. انطباق دو توالی در نرم افزار SnapGene V5.2 انجام و اطلاعات کامل مناطق کدکننده شامل اگزون‌ها اینترون‌ها روی نسخه نهایی توالی در این نرم‌افزار تکمیل شد. جهش‌های نقطه‌ای گزارش‌شده در محدوده ژن‌های *MRGH12* و *MRGH13* در مرورگر ژنومی ملون در پایگاه MELONOMICS بررسی شد. آغازگرهای اختصاصی برای این ژن ها با استفاده از نرم‌افزار SnapGene V 5.2 طراحی شد. آغازگرهای اختصاصی PSh21-F (5'-ATG ACT CGA CTT CCC GAA CCG AA-3') و PSh21-R (5'-TTG GCC ATC TCT CTG GAT GGC AT-3') برای ردیابی ژن *MRGH13* و آغازگرهای اختصاصی PSh27-F (5'- TTC TCC TGC AAG GAC ACC AAG CC -3') و PSh27-R (5'- GCT CTG AGG CGA CAA GGC ATC AT -3') برای ردیابی ژن *MRGH12* بر اساس گزارش‌های قبلی (Abbaspour & Shokouhifar, 2012a) مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA

نمونه‌برداری برگ‌های جوان در مراحل پنج برگی از سه بوته مربوط به هر رقم انجام شد و برگ های هر قم با یکدیگر پودر و جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های برگی تهیه‌شده با استفاده از هاون چینی و با استفاده از ازت مایع پودر گردیدند. استخراج DNA با استفاده از روش D & D انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). کمیّت و کیفیّت DNAی استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

انجام PCR

جهت تکثیر توالی هدف، در واکنش‌های جداگانه مقدار ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی در حجم واکنش ۱۰ میکرولیتری حاوی ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۴۰۰ میکرومولار dNTPs (Parstous) و یک میکرولیتر بافر 10X PCR (Parstous)، ۵ پیکومول از هر یک از آغازگرها (ساخته‌شده توسط Macrogene, South Korea)، یک واحد آنزیم تک پلیمراز (GeNetBio, South Korea) اضافه شد و برنامه حرارتی پس از بهینه کردن به‌صورت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سلیسیوس و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلیسیوس، ۳۰ ثانیه در ۶۱ درجه سلیسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس) و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (Eppendorf, Co. Germany) انجام گردید. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ درصد از رنگ Green viewer (Parstous) الکتروفورز گردید و تصویر الگوی باندی تکثیرشده از نمونه با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد.

آنالیز نرم‌افزاری توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13*

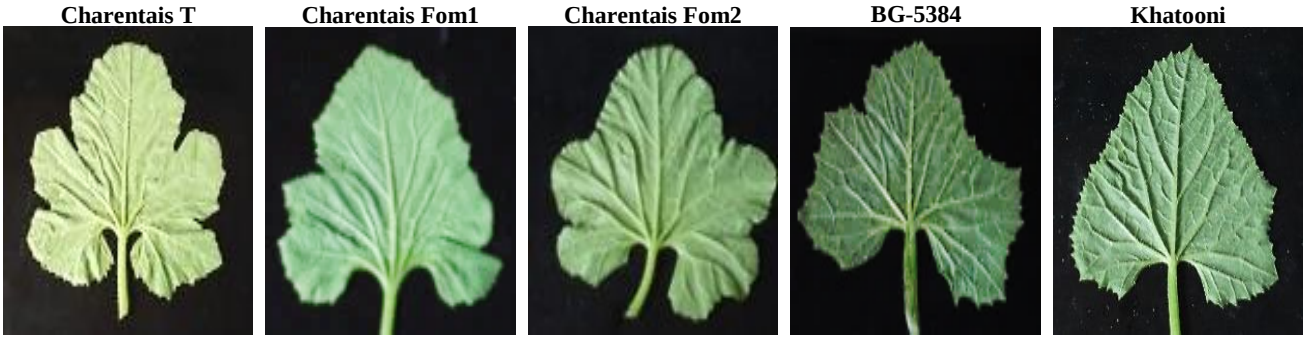
توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* در ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro) آنالیز شد. خانواده پروتئینی مربوط به پروتئین MRGH13 تعیین شد. دمین‌های کارکردی و توالی‌های کدکننده آن‌ها تعیین‌شده و روی توالی استحصال‌شده در نرم‌افزار SnapGene منطبق گردیدند. فرآیندهای زیستی مرتبط با این پروتئین با استفاده از ابزار تحت شبکه پایگاه QuickGO (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/)، در مرکز بیوانفورماتیک اروپا[1] (EMBL-EBI)، (https://www.ebi.ac.uk/interpro) بررسی شدند.

نتایج

توصیف صفات ظاهری ارقام ملون

در شکل ظاهری سطح برگ ارقام ملون مورد مطالعه تفاوت مشاهده شد (شکل ۱). در رقم 'Charentais T' در مقایسه با دیگر ارقام چهار فرورفتگی عمیق تر نسبت به سایرین در حاشیه برگ قابل مشاهده است که این رقم را از ارقام دیگر متمایز می‌نماید. در مقابل در رقم 'Charentais Fom2' چهار فرورفتگی سطحی است شکل برگ در دو رقم 'Charentais Fom1' و 'BG-5384' حد واسط ارقام قبلی است. در نیمی از برگ شیارهای حاشیه باریک و نسبتا فرورفته و نیم دیگر برگ فرورفتگی به‌صورت انحناء و سطحی بود. در رقم خاتونی برگ‌ها واجد راس مشخص، نوک‌تیز و مثلثی بوده و فرورفتگی‌های سطحی آن از سایر ارقام کمتر می‌باشد (شکل ۱).

1- The European Bioinformatics Institute



شکل ۱- شکل برگ و فرم لوپ‌ها در پنج رقم ملون مورد مطالعه (به‌ترتیب از راست به چپ شامل رقم محلی به نام'Khatooni'، و ارقام استاندارد ملون با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* به نام‌های 'BG-5384'، 'Charentais Fom2'، 'Charentais Fom1' و 'Charentais T' می‌باشند)

Figure 1- The leaf shape and lopes form in the five studied melon cultivars (fom left to right: 'Khatooni', 'BG-5384', 'Charentais Fom2', 'Charentais Fom1'and 'Charentais T', respectively)

بر اساس کلید مشخصات برگ در ارقام ملون (IPGRI, 2003) می توان شکل برگ را در رقم خاتونی از نوع برگ کامل (Entire)، در رقم BG-5384 شکل برگ در گروه برگ کامل (Entire) با شیارهای کم عمق (shallow) قرار می‌گیرد. برگ‌های رقم Charentais Fom1 شکل برگ حدواسط برگ کامل (Entire) و پنج لوپ (Pentalobate) قرار می‌گیرند که شیارهای کم عمق (shallow) در آن دیده می‌شود. در ارقام Charentais T و Charentais Fom2 از نوع پنج لوپ (Pentalobate) که به‌ترتیب دارای شیارهای عمیق (deep leaf lobes) و شیارهای متوسط (Intermediate leaf lobes) دسته‌بندی می‌شوند. مشاهدات نشان داد در رقم Charentais T برگ‌ها به وضوح چندبخشی هستند. در مواردی که فرورفتگی عمیقی در حاشیه برگ وجود داشته باشد اصطلاحا برگ را چندبخشی (Lobed) می‌نامند. در مرکبات از شکل نوک برگ جهت تایید تلاقی‌ها و نتاج هیبرید استفاده شده است (Traband *et al.*, 2023). در ملون نیز می‌توان از صفات ظاهری مانند شکل برگ و میوه در تمایز تنوع ژنتیکی و ارقام استفاده نمود (Stepansky *et al.*, 1999).

این نتایج نشان داد بر اساس فرورفتگی‌های حاشیه برگ می‌توان ارقام ملون مورد ارزیابی در این مطالعه را از یکدیگر متمایز نمود. برگ های چهار رقم استاندار مورد مطالعه همگی به دسته کانتالوپنسیس مربوط می‌شوند. این برگ‌ها از نظر لوپ‌ها و فرورفتگی حاشیه برگ با یکدیگر متمایز هستند. رقم خاتونی تنها رقم مربوط به دسته اندوروس (inodorus) است که در این مطالعه مورد بررسی بوده است، برگ این رقم فاقد لوپ و فررفتگی‌های حاشیه‌ای برگ می‌باشد و بخوبی از چهار رقم دیگر قابل تمایز است. شکل برگ در توصیف تعدادی از گونه‌های ملون مورد توجه بوده است (Ajuru & Okoli, 2013). نتایج نشان داد در رقم Charentais T برگ‌ها به خوبی چندبخشی هستند. ولی در این مطالعه هم به نوع برگ و هم به برگ-های چندبخشی جهت توصیف ارقام توجه شده است. استفاده از شکل برگ و توارث آن می‌تواند در انتخاب اولیه نتاج حاصل از تلاقی مفید باشد.

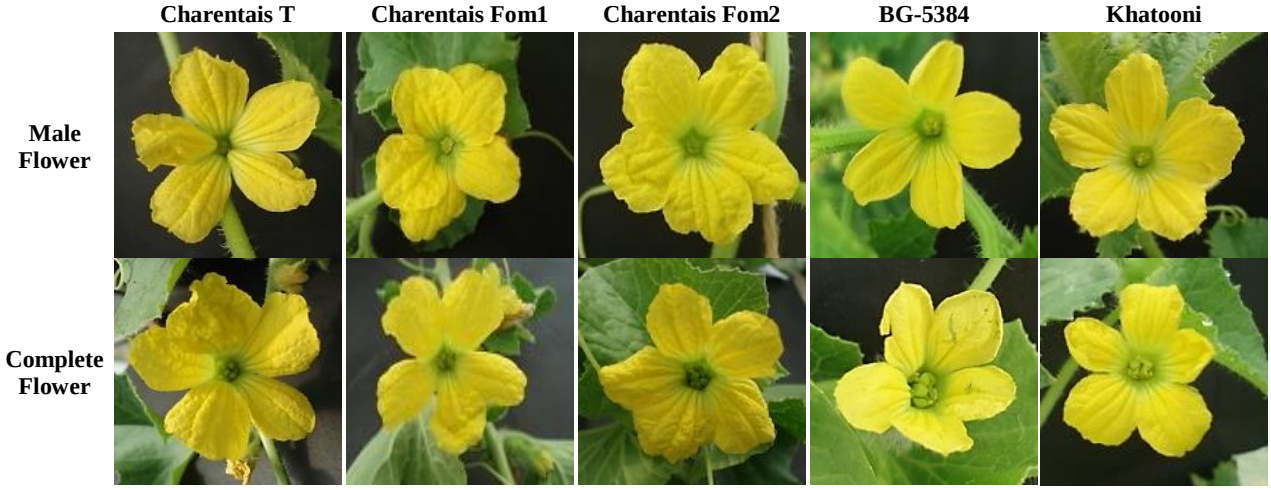
در ارقام مورد مطالعه گل نر و گل کامل مشاهده شد (شکل ۲). گلبرگ‌های زرد و کاسبرگ‌های سبز بطور مشابه به تعداد پنج عدد در ارقام تظاهر یافت. در گیاهان رشد یافته در شرایط گلخانه از نظر زمانی گل‌های نر در تمام ارقام قبل از گل‌های کامل ظاهر شدند. در ارقام Charentais Fom1 و Charentais T گل نر و گل کامل ظاهر شدند. مشاهده گل‌های متفاوت می‌تواند در برنامه اصلاحی و انجام تلاقی‌ها با اهمیت ویژه‌ای مورد توجه قرار گیرد.

آرایش گلبرگ‌ها نیز در ارقام مورد مطالعه متفاوت بود. در رقم Charentais T و BG-5384 گلبرگ‌های گل‌های نر همپوشانی نداشته و کاملا از هم مجزا بودند، در حالی‌که در رقم Charentais Fom1 و Charentais Fom2 گلبرگ‌های گل‌های نر همپوشانی داشتند (شکل ۲). در رقم خاتونی در گل‌های ماده همپوشانی گلبرگ ها در چهار رقم اندک بود. در بررسی‌های انجام‌شده روی گل‌های دیگر گونه‌های ملون تنها به بیان تعداد گلبرگ‌ها اشاره شده است و الگوی همپوشانی آن‌ها ذکر نشده است.

در رقم BG-5384 علاوه بر گل نر، گل ماده (شکل ۳-A) نیز مشاهده‌شد. در رقم Charentais Fom2 گل نر و گل ماده و علاوه بر آن گل کامل نیز مشاهده شد. تعداد گلبرگ در گل‌های نر، ماده و کامل در ارقام مختلف یکسان و پنج عدد بود. تنها در رقم Charentais Fom2 علاوه بر گل‌های نر پنج گلبرگی، تعدادی از گل‌های نر با تعداد شش گلبرگ نیز مشاهده شد (شکل ۳-B). در مطالعات مشابه دیگر نیز تعداد گلبرگ‌ها در گل‌های نر پنج عدد گزارش شده است (Ajuru & Okoli, 2013). مقایسه الگوی گل‌ها

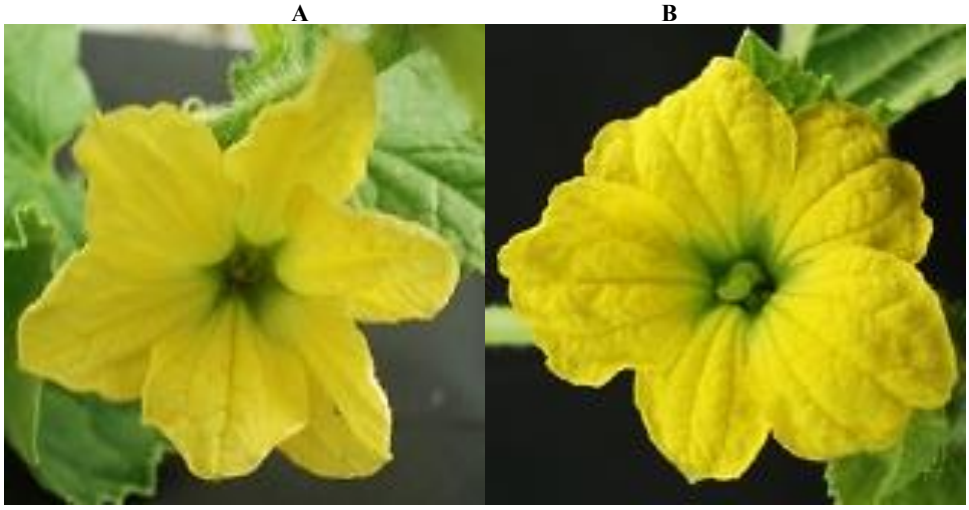
نشان می‌دهد که از نظر حضور گل‌های نر، ماده و گل کامل امکان تمایز ارقام وجود دارد.

در ارقام استاندارد مورد بررسی میوه از نوع پپو است. مشخصات و ویژگی‌های میوه در ارقام استاندارد به دو صورت کمّی و کیفی بررسی شد. از نظر کیفی، شکل میوه، رنگ پوست، نقش پوست، رنگ گوشت و شکل حفره میانی مورد توجه قرار گرفت. از نظر میوه هم ارقام با هم تفاوت داشتند (شکل ۴). در ارقام BG-5384 و خاتونی میوه بیضی شکل و در سایر ارقام کروی شکل بودند. رنگ پوست میوه در رقم BG-5384 سبز تیره است درحالی‌که در سایر ارقام سبز روشن است. در رقم خاتونی رنگ پوست زرد کمرنگ با خطوط سبز می‌باشد. نقش پوست میوه در ارقام Charentais Fom1 و Charentais Fom2 به‌صورت نواری، در رقم BG-5384 به‌صورت خطدار، در رقم Charentais T دارای لکه و در رقم خاتونی بصورت راه راه می‌باشد. رنگ گوشت میوه به‌صورت نارنجی است که در رقم BG-5384 مقداری کم‌رنگ‌تر بوده و در رقم خاتونی سبز کمرنگ می‌باشد. شکل حفره میانی در رقم BG-5384 مثلثی شکل، و در ارقام Charentais T، Charentais Fom1 و Charentais Fom2 دایره‌ای شکل بود. ویژگی‌های مختلف از جمله برخی از صفات ظاهری مربوط به رقم خاتونی در مطالعات دیگری نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Sobhani *et al*., 2015).



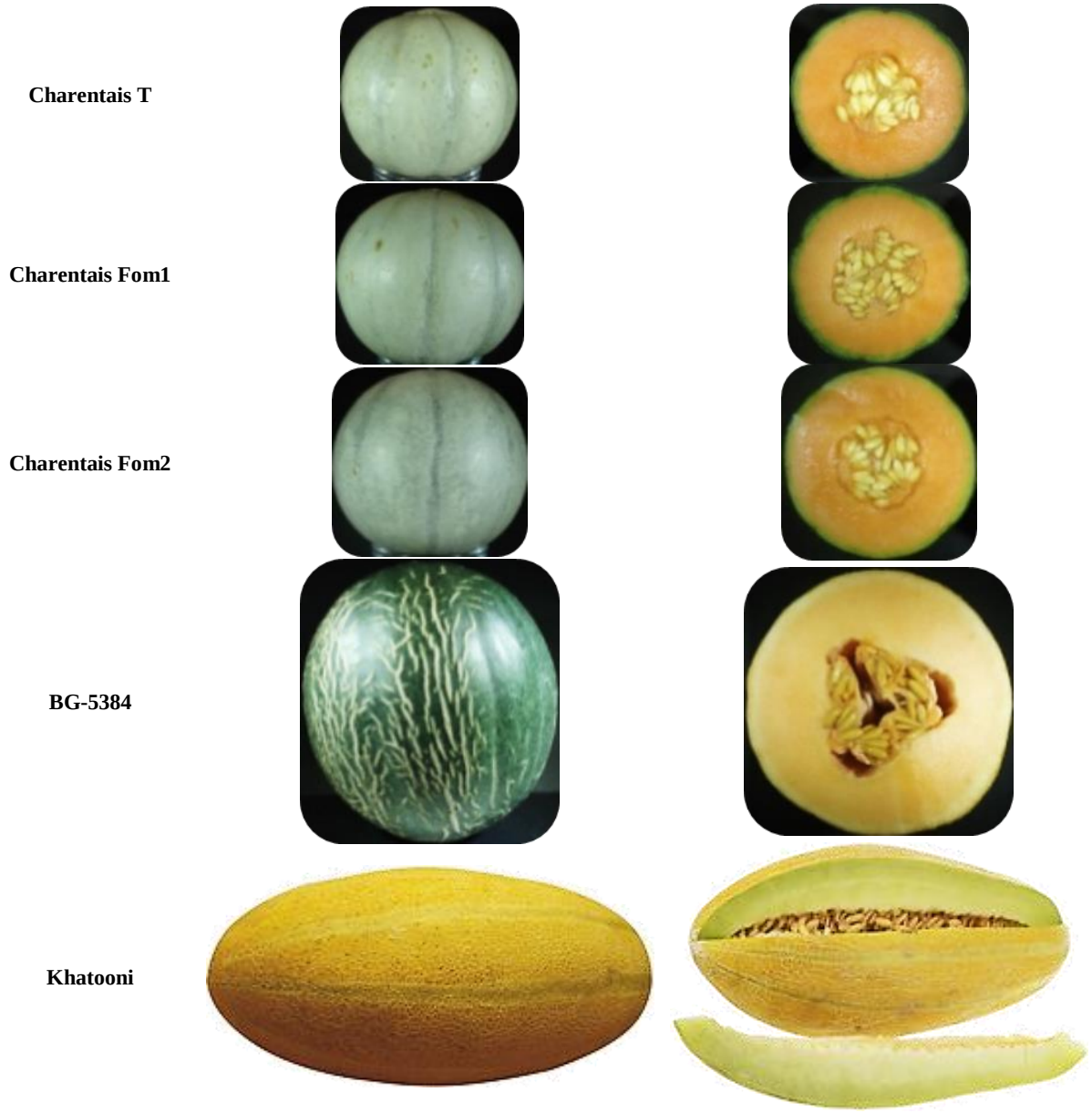
شکل ۲- شکل گل نر (Male Flower) و گل کامل (Perfect flower) در ارقام مختلف ملون مورد مطالعه

Figure 2- The shape of male flower and perfrct flower in different studied melon cultivars



شکل ۳- گل ماده (A) و گل نر شش گلبرگی (B) در ملون رقم 'Charentais Fom2'.

Figure 3- Female flower (A) and six-petalled male flower (B) in melon cv. 'Charentais Fom2'



شکل ٤- شکل ظاهری، شبکه سطح میوه،شکل برش عرضی و طولی میوه، حفره محل بذور در ارقام استاندارد ملون حامل ژن‌های مقاومت به قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی در مقایسه با رقم محلی 'خاتونی'

Figure 4- The Fruits type, longitudinal and transverse diameter of fruits, fruit surface nets, seed hole shape in standard melon cultivars harboring resistance genes to Fusarium vascular wilt disease compared to the local 'Khatooni' cultivar

صفات کمی میوه، مانند وزن، قطر میوه و حفره میانی و وزن بذور، در ارقام مورد مطالعه، متفاوت بود (جدول ۱). میوه رقم BG-5384 از نظر وزن نیز نسبت به سه رقم دیگر در رتبه بالاتری قرار داشت. در ارقام استاندارد بیشترین و کمترین طول میوه به‌طور متوسط به‌ترتیب با ۲۲/۸ سانتی‌متر در رقم BG-5384 و ۱۶/۸ سانتی‌متر در رقم Charentais Fom1 مشاهده شد. بیشترین و کمترین قطر میوه بطور متوسط به‌ترتیب ۲۱/۳ سانتی‌متر در رقم BG-5384 و ۱۷/۲ سانتی‌متر در رقم Charentais T است. رقم BG-5384 و رقم Charentais T بطور متوسط بیشترین و کمترین وزن میوه را به خود اختصاص داد. وزن میوه دو رقم Charentais Fom1 و Charentais Fom2 اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. از نظر قطر گوشت میوه سه رقم Charentais T، Charentais Fom1 و Charentais Fom2 مشابه بودند و تنها در رقم BG-5384 اندکی قطر میوه ضخیم‌تر بود. وزن ۱۰ دانه بذور در رقم BG-5384 با اختلاف حدود سه برابری از دیگر ارقام استاندارد مورد مطالعه سنگین‌تر بود (جدول ۱).

تفاوت ویژگی‌های میوه در ارقام مختلف ملون مورد ارزیابی قرار گرفته و است و تنوع بسیار بالائی در این ویژگی‌ها گزارش شده است (Soltani *et* , Sobhani *et al.*, 2015Ajuru & Okoli, 2013 , *al.*, 2022). در اکثر مطالعات شاخص‌های وزن هزار دانه بذر و همچنین وزن بذر هر میوه مورد ارزیابی بوده است ولی در مطالعه حاضر به‌دلیل محدودیت در بذور ارقام مورد ارزیابی و انجام مراحل کشت و پرورش گیاه در گلخانه تعداد گیاهچه‌ها و میوه‌های تولید شده بسیار محدود بود و به‌عنوان مثال وزن ۱۰ دانه بذر شمارش و به‌عنوان شاخص برای مقایسه ارقام مورد توجه قرار گرفته است.

ردیابی ژن‌های *MRGH* در توالی ژنومی ملون

نتیجه بلاست توالی ژن‌های گروه لینکاژی *MRGH21* در ژنوم رفرنس ملون با شماره بازیابی GCF_025177605.1 نسخه شماره ۱۰۲ آزادشده در تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲ در پایگاه داده‌های ژنومی NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/) نشان داد این گروه لینکاژی در محدوده ۱۶۹۲۵۹۲ باز تا ۱۸۰۹۹۵۲ باز روی قطعه ژنومی با شماره بازیابی NW_007546318.1 به طول تقریبی ۱۱۷ کیلوباز قرار گرفته‌اند. در حدفاصل ژن‌ها در این منطقه در حدود پنج منطقه توالی‌یابی نشده وجود دارد (شکل ۵). داده‌های این پایگاه نشان داد منطقه دربرگیرنده این گروه لینکاژی روی اسکافولدی قرار گرفته است که در این نسخه از ژنوم روی توالی هیچ یک از ۱۲ کروموزوم ملون مکان‌یابی نشده است.

نتایج نشان داد مطابق با گزارش‌های قبلی (Morata & Puigdomènech, 2017) توالی ژن‌های *MRGH* روی ژنوم ملون نشان داد گروه لینکاژی *MRGH21* حد فاصل دو ژن *MRGH12* و *MRGH13* قرار گرفته‌است. در این گروه لینکاژی ژن *MRGH9* نیز قرار دارد. براساس مطالعات انجام‌شده ژن *MRGH9* همان ژن *Fom-1* است (Brotman *et al.*, 2013) که مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲ را سبب می‌شود (Risser & DW, 1976).

لذا با بررسی توالی ژن‌های *MRGH* روی داده‌های ژنومی ملون نسخه V4.0 ذخیره شده در پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics) اطلاعات دقیق‌تری حاصل شد (شکل ۶). در این نسخه علاوه بر اینکه این گروه لینکاژی روی کروموزوم شماره Chr09 مکان‌یابی شده بود، بسیاری از فاصله‌های خالی میان توالی این منطقه نیز تکمیل شده بود. ردیابی منطقه‌ای به طول تقریبی ۱۶۸/۹ کیلوباز در برگیرنده ژن های گروه لینکاژی *MRGH21* در این نتایج نشان داد که در حدفاصل دو ژن *MRGH12* (MELO3C022143.2.1) و *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) مجموعه از ژن‌های R مانند ژن *MRGH9* (MELO3C022146.2.1) و ژن *MRGH21* (MELO3C022148.2.1) قرار دارند.

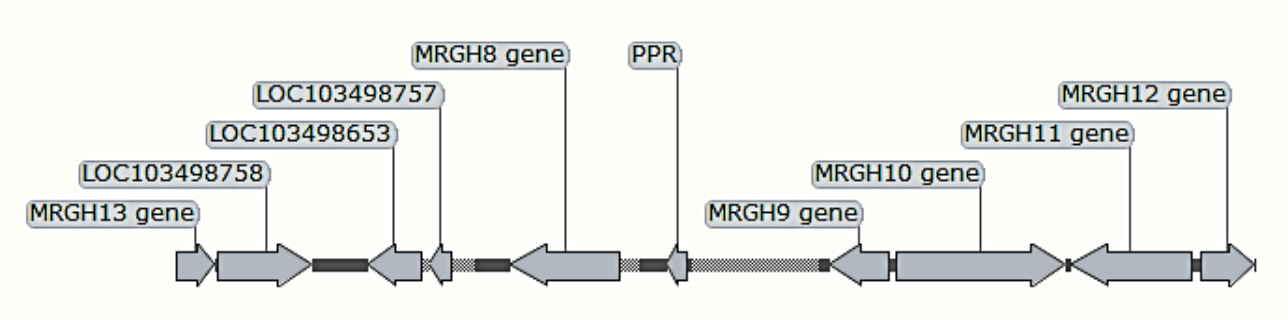
جدول ۱- مشخصات میوه و بذر چهار رقم استاندارد ملون حامل سطوح مقاومتی مختلف در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی

Table 1– Fruit and seed characteristics of four standard melon cultivars with different resistance levels against Fusarium wilt disease

مشخصات میوه و بذر Fruit and seed characteristics	ارقام ملون Melon cultivars			
	Charentais T	Charentais F1	Charentais F2	BG-5384
وزن میوه Fruit weight (g)	288.5 ± 34.8	335.4 ± 56.1	361.5 ± 51.2	1099.3 ± 62.7
قطر میوه Fruit diameter (cm)	17.2 ± 1.6	18.4 ± 2.7	19.2 ± 2.5	21.3 ± 3.1
طول میوه Fruit length (cm)	16.8 ± 1.7	17.7 ± 2.7	18.5 ± 2.5	22.8 ± 3.3
ضخامت گوشت میوه Flesh thickness (cm)	6.5 ± 0.8	6.8 ± 1.2	7 ± 1.1	7.7 ± 1.4
قطر حفره Fruit cavity diameter (cm)	4.2 ± 0.2	4.8 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.6 ± 0.4
وزن ۱۰ عدد بذر Weight of 10 seeds (g)	1.3 ± 0.02	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.02	4.1 ± 0.05

* متوسط داده‌های مربوط به سه تکرار بعلاوه و منهای خطای استاندارد میانگین هر سه داده ارائه شده است.

*Average data of three replicates ± the standard error of the average of all three data are presented.



شکل ۵- توالی محدوده ۱۶۹۲۵۹۲ تا ۱۸۰۹۹۵۲ بازی روی قطعه ژنومی با شماره بازیابی NW_007546318.1 به طول تقریبی ۱۱۷ کیلوباز دربرگیرنده ژن‌های گروه لینکاژی *MRGH21* روی ژنوم رفرنس ملون با شماره بازیابی GCF_025177605.1 نسخه شماره ۱۰۲ آزاد شده در تاریخ ۱۳ اکتبر ۲۰۲۲

Figure 5- The sequence range of 1692592 to 1809952 bp on the genomic fragment with the retrieval number of NW_007546318.1 and an approximate length of 117 kb including *MRGH21* linkage group genes on the Melon reference genome with the retrieval number of GCF_025177605.1 version number 102 released on October 13, 2022

شکل ٦- محدوده ٦٨٦٨٨٣ تا ٧٨٣٥٨٠ بازی از کروموزوم شماره Ch09 ملون استحصال‌شده از داده‌های ژنومی ملون نسخه V4.0

Figure 6- The sequence range of 686883 to 783580 bp from chromosome number Ch09 of Melon, retrieved from Melon genomic data version V4.0

ژن *MRGH13*

بررسی داده‌های موجود در بانک ژن و داده‌های ژنومی ملون در پایگاه NCBI در خصوص ژن *MRGH13* با شماره بازیابی LOC107991675 نشان داد که طول این ژن ۳۶۵۴ جفت باز است که در محدوده ۲۶۴۳ تا ۳۵۴۹ به طول ۹۰۷ جفت باز توالی آن نامشخص است و برای آن سه ناحیه اگزونی در محدوده‌های ۱-۵۴۲، ۱۳۸۲-۲۴۷۴ و ۳۶۳۷-۳۶۵۴ معرفی شده است. درحالی‌که بررسی داده‌های به‌دست آمده از پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics)، نشان داد ژن *MRGH13* به طول ۴۳۴۴ جفت باز (بدون در نظر گرفتن توالی‌های تنظیمی و غیر ترجمه‌شونده بالادست و پائین‌دست آن) در محدوده نوکلئوتیدهای ۷۷۹۲۴۴ تا ۷۸۳۵۸۰ روی کروموزوم Chr09 قرار گرفته‌است (شکل ۷-A). در این داده چهار ناحیه اگزونی توسط توالی های اینترونی از یکدیگر جدا شده‌اند و در محدوده‌های ۱-۵۴۲، ۱۳۸۲-۲۴۸۲، ۲۵۷۲-۲۸۷۷ و ۳۱۹۶-۴۳۴۴ به‌ترتیب به طول‌های ۵۶۱، ۱۱۰۱، ۳۰۶ و ۱۱۴۶ جفت باز در این ژن پیش‌بینی شده است که در مجموع توالی کدکننده آن به طول ۳۱۱۴ نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۷-B).

مقایسه توالی این ژن در ارقام مختلف ملون به شناسایی جهش های مختلفی در نواحی اگزونی و اینترونی منتج شده است که در داده‌های ژنومی در پایگاه MELONOMICS قابل مشاهده است (شکل ۷-A). بر این اساس انتظار می‌رود ردیابی این ژن در ارقام ملون با سطوح مقاومتی مختلف در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی نیز بتواند به تمایز این ارقام کمک نماید.

ردیابی توالی ژن *MRGH13* در ارقام استاندارد ملون

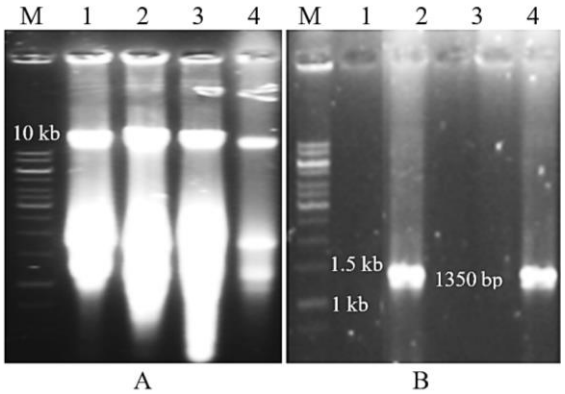
الگوی الکتروفورزی DNAی استخراج شده از ارقام مورد مطالعه کیفیّت و کمّیت مناسبی نشان داد (شکل ۸-A) نتایج ردیابی ژن *MRGH13* در ارقام ملون دارای سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* نشان داد که آغازگرهای طراحی‌شده قادرند تک باند اختصاصی را در اندازه مورد انتظار در برخی از ارقام ردیابی نمایند. در الگوی الکتروفورزی ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 تک باند در محدود میان دو باند ۱ kb و ۱/۵ kb مشاهده شد در حالی‌که این باند در ارقام Charentais T و Charentais Fom2 با جفت آغازگر اختصاصی PSh21-F/R قابل ردیابی نبود (شکل ۸-B).

شکل ۷- (A) نمای شماتیک موقعیت ژن *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) در محدوده ۷۷۹۲۴۴ تا ۷۸۳۵۵۰ و اندازه ٤/٣٤ کیلوباز روی کروموزوم شماره Chr09 در واریته‌های مختلف ملون رسم‌رشده با مرورگر ژنومی ملون (https://www.melonomics.net/melonomics.html#/jbrowse)

نقاط آبی‌رنگ نشان‌دهنده جهش‌های نقطه‌ای شناسایی‌شده در محدوده ژنومی در واریته مختلف ملون هستند. (B) نمای شماتیک ژن *MRGH13* نشان‌دهنده موقعیت اگزون‌ها و جایگاه اتصال آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده، قطعه قابل‌تکثیر از محتوی ژنومی ارقام ملون و جایگاه دمین‌های شناسایی‌شده با آنالیز توالی پروتئین در ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) را نشان می‌دهند.

Figure 7- (A) Schematic representation of *MRGH13* gene position (MELO3C000335.2.1) in the sequence range of 779244 to 783550 and size of 4.34 kb on the chromosome number Chr09 in different varieties of melon drawn with Melon Genome Browser (https://www. melonomics.net/melonomics.html#/jbrowse)

The blue dots represent point mutations identified in the genomic range of different melon varieties. (B) Schematic representation of *MRGH13* gene showing the position of exons, the annealing site of the designed specific primers, the amplifiable fragment of the genomic content of melon cultivars and the location of domains identified by protein sequence analysis in the InterPro web tool. https://www.ebi.ac.uk/interpro/).



شکل ۸- (A) الگوی الکتروفورزی DNA ی استخراج‌شده از ارقام ملون، (B) محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی PSh21-F/R. ۱، ۲، ۳ و ٤ به ترتیب ارقام ملون 'Charentais T'، 'Charentais Fom1'، 'Charentais Fom2' و 'BG-5384' می‌باشند. M نشانگر یک کیلوبازی DNA می‌باشد.

Figure 8- (A) DNA electrophoresis pattern extracted from melon cultivars, (B) Amplified PCR product with PSh21-F/R specific primers. 1, 2, 3 and 4 are melon cultivars 'Charentais T', 'Charentais Fom1', 'Charentais Fom2' and 'BG-5384', respectively. M represents 1kb DNA size marker.

توالی و دمین‌های کارکردی پروتئینی کدشونده توسط ژن *MRGH13*

ساختار ژن *MRGH13* پیش‌بینی‌شده بر اساس آنالیز داده‌های به‌دست آمده از پایگاه MELONOMICS (https://www.melonomics.net/melonomics)، نشان می‌دهد که این ژن می‌تواند پروتئینی به طول ۱۰۳۸ اسیدآمینه را کد نماید (شکل ۷–B). آنالیز توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* در ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) نشان داد این پروتئین عضو خانواده پروتئین‌های مقاومت گیاهی[1] (IPR044974) حامل توالی های تکراری غنی از لوسین[2] (PTHR11017) می‌باشد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت حضور دمین‌های TIR، NB-ARC و LRR در آن تأیید شد (شکل ۹).

دمین TIR (IPR000157) یک دمین سیتوپلاسمی محافظت شده به شمار می‌رود که حدوداً از ۲۰۰ اسیدآمینه تشکیل شده است. همان‌گونه که در شکل ۷–B نشان داده شده است، جایگاه این دمین در طول پروتئین MRGH13 در محدوده موقعیت اسیدآمینه‌های ۳۶ تا ۲۰۸ قرار گرفته است و توسط اگزون‌های اول و دوم کد می‌شود. دمین NB-ARC (IPR002182) یک موتیف دخیل در انتقال پیام-های دفاعی در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها است که در پروتئین‌های دخیل در مقاومت گیاهان به بیمارگرها نیز مشاهده شده‌است. جایگاه این دمین در طول پروتئین MRGH13 در محدوده موقعیت اسیدآمینه‌های ۲۳۶ تا ۴۴۳ قرار گرفته‌است و توسط اگزون شماره دو کد می‌شود.

حضور دو نسخه از دمین LRR (IPR013210) در طول پروتئین MRGH13 پیش‌بینی شده است که نسخه اول آن در محدوده موقعیت اسیدآمینه‌های ۵۶۷ تا ۷۵۲، و نسخه دوم آن در محدوده اسیدآمینه‌های ۷۵۳ تا ۹۹۴ قرار گرفته است. نسخه اول به وسیله اگزون سوم و چهارم و نسخه دوم به‌طور کامل به‌وسیله بخش انتهایی اگزون چهارم کد می‌شود.

پیش‌بینی فرآیندهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13

یافتن روابط میان فعالیت‌های مختلف سلولی می‌تواند در شناسایی فرآیندهای سلولی و مدل‌سازی آن‌ها تأثیر به‌سزایی ایفا نماید. ابزار تحت شبکه QuickGO ارائه‌شده توسط مرکز بیوانفورماتیک اروپا[3] (EMBL-EBI)، ابزاری سریع برای مرور هستی‌شناسی ژن‌ها و بررسی کارکردهای پروتئین محصول یک ژن به شمار می‌رود (Consortium, 2015). نتیجه بررسی توالی پروتئین MRGH13 در ابزار QuickGO نشان داد که این پروتئین می‌تواند نقش انتقال پیام (GO0007165) را در فرآیندهای زیستی ایفاء نماید (شکل ۱۰). این پیام می‌تواند در ایجاد تغییر در فعالیت و یا وضعیت یک سلول مؤثر باشد. انتقال پیام با دریافت آن توسط گیرنده‌ها مثل ارتباط لیگاند به گیرنده، انجام می‌شود و با تنظیم یک فرآیند سلولی مانند تنظیم رونویسی از دسته‌ای از ژن ها و یا تنظیم یک فرآیند متابولیک در پائین دست خاتمه می‌یابد. نتایج بدست‌آمده از آنالیز GO نشان می دهد که پروتئین MRGH13 با کارکرد خود می‌تواند در فرآیندهای متعدد سلولی نقش داشته باشد. همان‌گونه که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود عملکرد این پروتئین می‌تواند بخشی از فرآیندهای تبادل اطلاعات بین‌سلولی (GO:0007154)، پیام رسانی (GO:0023052) و پاسخ‌دهی سلولی به محرک‌ها (GO:0051716)، به شمار آید.

از جمله مسیرهای زیر شاخه انتقال پیام مرتبط با کارکرد زیستی این پروتئین می‌توان به مسیر پیام‌رسانی تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی[4] (GO:0002764)، مسیرهای پیام‌رسانی مبتنی بر سالیسیلیک‌اسید[5] (GO:0009863) و مسیر پیام‌رسانی مرگ نکروزشدگی[6] (GO:0097527) اشاره کرد.

بحث

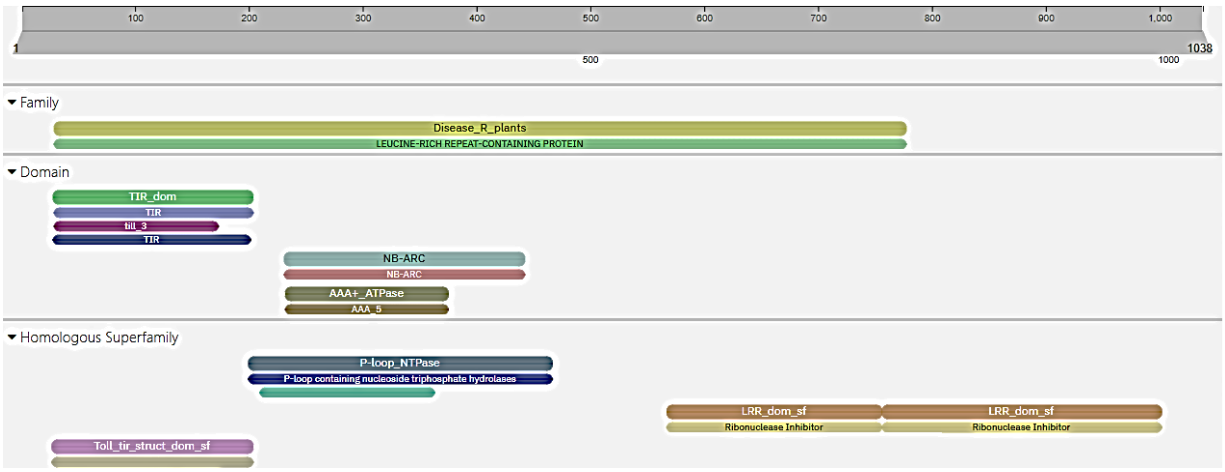
دست‌یابی به نشانگرهای مناسب جهت تمایز ارقام ملون مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌تواند پیشبرد برنامه‌های اصلاحی را با دقت و سرعت بالاتری تقویت نماید. در این مطالعه با بررسی صفات مختلف ظاهری از جمله شکل برگ، گل‌های نر، ماده و نرماده، و پس از چیدن میوه‌ها، وزن میوه، قطر و طول میوه ، قطر گوشت و حفره میانی، سایز طولی و عرضی بذور در ارقام استاندارد ملون به نام‌های Charentais T، Charentais Fom1، Charentais Fom2 و BG-5384 که دارای سطوح مقاومتی متفاوتی در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی هستند، امکان تمایز این ارقام را از یکدیگر مهیا نمود. از این صفات ظاهری در تعدادی از مطالعات جهت تمایز ارقام ملون استفاده شده‌است (Ajuru & Okoli, 2013). نتایج مطالعه حاضر نشان داد براساس صفاتی ظاهری مورد مطالعه مانند شکل برگ، حضور گل کامل، تعداد گلبرگ‌ها، می‌توان اختلافاتی بین ارقام مورد مطالعه مشاهده نمود، ولی نکته قابل‌توجه این است که در برنامه‌های گزینشی دست‌یابی به این صفات ظاهری با توجه به تعداد زیاد نمونه

1- Disease resistance protein
2- Leucine-Rich Repeat-Containing Protein
3- The European Bioinformatics Institute
4- Immune Response-Regulating Signaling Pathway
5- Salicylic Acid Mediated Signaling Pathway
6- Necroptotic Signaling Pathway

های مورد بررسی کاری بسیار زمان‌بر و هزینه‌بر خواهد بود و در صورت دراختیار بودن نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفت مقاومت انتظار می‌رود راندمان برنامه‌های اصلاحی بطور چشمگیری افزایش یابد.

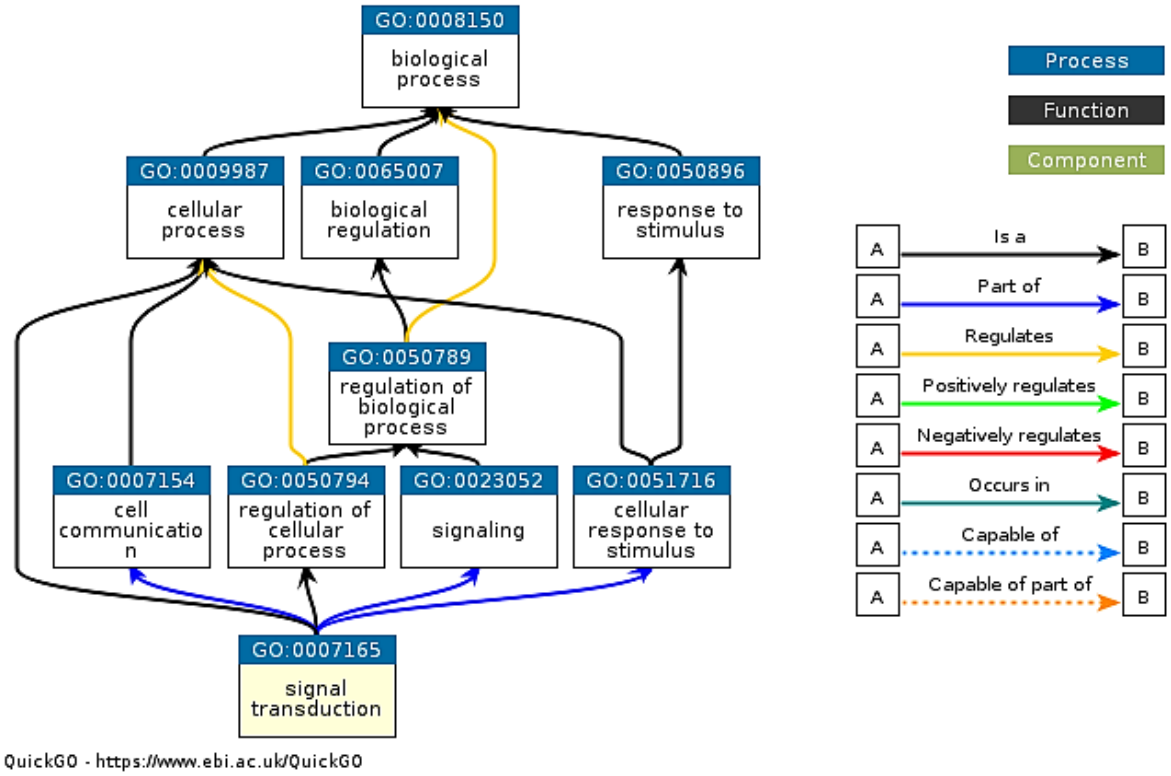
ردیابی ژن‌های مقاومت *MRGH* و گروه‌های لینکاژی آن‌ها در ژنوم ملون با توجه به داده‌های انبوه زیستی فراهم شده و هم‌چنین در اختیار بودن توالی ژنومی تقریبا کامل این گیاه، می‌تواند در شناسایی نشانگرهای مولکولی مناسب مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه حاضر گروه لینکاژی *MRGH21* حامل تعدادی از ژن‌های مقاومت از جمله ژن مقاومت *FOM1* در داده‌های ژنومی ملون شناسایی شد و با مقایسه داده‌های ارائه‌شده در بانک ژن محدوده قرارگیری این گروه لینکاژی با شماره بازیابی NW_007546318.1 روی آخرین نسخه توالی آزادشده در پایگاه NCBI مکان‌یابی شد. بررسی داده‌های ژنومی در در پایگاه MELONOMICS نشان داد این گروه لینکاژی روی کروموزوم شماره Chr09 حدفاصل دو ژن *MRGH12* (MELO3C022143.2.1) و *MRGH13* (MELO3C000335.2.1) قرار دارد. براساس توالی کامل به‌دست آمده از این پایگاه و با توجه به جهش‌های متنوع گزارش‌شده در توالی ژن *MRGH13* در ارقام مختلف ملون بررسی روی توالی این ژن متمرکز شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی این ژن در ارقام ملون موردمطالعه انجام شد و آنالیزهای صورت‌گرفته نشان داد با استفاده از یک جفت آغازگر می‌توان با دقت بسیار بالایی ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 را از دو رقم Charentais T و Charentais Fom2 متمایز نمود.

الگوی مقاومتی ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 در برابر نژادهای قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* نشان می‌دهد این دو رقم هر دو در برابر نژاد R2 مقاوم هستند (Alvarez *et al*., 2005). انتظار می‌رود مطابق با گزارش‌های صورت‌گرفته (Zink & Thomas, 1990, Zheng & Wolff, 2000) عامل ژنتیکی مقاومت در برابر نژادهای R۱ و R۲ در این قارچ در ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 به‌دلیل حضور ژن *Fom2* باشد. با این‌حال حضور ژن *Fom2* در ارقام مختلف از جمله ارقام استاندارد مقاوم و حساس گزارش شده است. هرچند جهش‌هایی در ژن *Fom2* میان ارقام مقاوم و حساس گزارش شده است ولی میان الگوی حضور جهش‌ها و الگوی مقاومت ارقام انطباق مشاهده نشده است (Shokouhifar *et al*., 2016). با توجه به تنوع بالای ارقام ملون، تاکنون تعداد زیادی از ژن‌های دارای ساختارهای مشابه ژن‌های مقاومت شناسایی و گزارش شده است (Garcia-Mas *et al*., 2012). این گزارش‌ها این احتمال را مطرح می‌نماید که ژن‌های دیگری نیز می‌تواند در برهمکنش میان ارقام ملون و نژادهای مختلف قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* و بروز الگوی مقاومتی آن مؤثر باشد. بررسی‌های صورت‌گرفته روی ۳۱۴ ژن R کلون‌شده نشان داده است که ۹ سازوکار مختلف با توجه به دمین‌های کارکردی مختلف، توسط این ژن‌ها جهت القاء و یا تقویت سامانه‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها شناسایی شده است (Kourelis & van der Hoorn, 2018). گزارش ژن مقاومت منفرد و غالب *Fom-3* از کولتیوار Perlita-FR (Zink, 1985) که در بروز مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲ مؤثر است می‌تواند این احتمال را تقویت نماید.



شکل ۹- نتیجه آنالیز توالی پروتئین MRGH13 به وسیله ابزار تحت شبکه InterPro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) نشان‌دهنده خانواده ژنی، دمین‌های شناسایی‌شده، بزرگ خانواده‌های پروتئینی مشابه و دمین‌های معرف این خانواده ها می‌باشد.

Figure 9- The result of MRGH13 protein sequence analysis using the InterPro web tool (https://www.ebi.ac.uk/interpro/) showing the gene family, identified domains, large similar protein families and domains represent these families.



شکل ۱۰- فرآیند زیستی پیش‌بینی‌شده برای پروتئین MRGH13 براساس نتیجه بررسی صورت‌گرفته در پایگاه InterPro GO (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0007165)

خطوط ترسیم‌شده مسیرهای اثرگذاری پروتئین را در فرآیندهای زیستی مختلف نشان می‌دهند.

Figure 10- Predicted biological process for MRGH13 protein based on the result obtained from InterPro GO database (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0007165)

Drawing lines show the pathways of protein involved in different biological processes.

به‌منظور بررسی بیشتر و پیش‌بینی کارکردهای پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* توالی این پروتئین در پایگاه InterPro انجام شد و نتایج تأیید نمود که این پروتئین به خانواده پروتئین‌های مقاومت حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین[1] (PTHR11017) متعلق می باشد. این خانواده پروتئین‌های گیرنده ایمنی درون سلولی را شامل می‌شوند که قادرند حضور مولکول‌های بیماری‌زا یا سیگنال‌های مشتق از میزبان را تشخیص دهند (Wang *et al.*, 2019). در گیاهان، شناسایی مستقیم یا غیرمستقیم عوامل بیماری‌زا توسط NLRها[2]، سبب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی متعددی از جمله مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، و یا پاسخ فوق حساسیت می‌شوند که می‌تواند توسعه پاتوژن را در گیاه تنها به همان محل شروع عفونت محدود نماید (Dangl *et al.*, 2013). پروتئین‌های NLRs میان گیاهان و جانوران مشترک هستند و به‌وسیله دمین‌های مرکزی محافظت‌شده NB و دمین الیگومرکننده (NOD)[3]، یک دمین غنی از لوسین انتهای C[4] و یک دمین متغییر در انتهای N توصیف می‌شوند (Maekawa *et al.*, 2011). در گیاهان این پروتئین‌ها بر اساس توالی انتهای N در دو گروه اصلی CC–NLRs[5] و TIR–NLRs[6] تقسیم‌بندی می‌شوند (Maekawa *et al.*, 2011).

دمین TIR در گیرنده‌های TLRs[7] و آداپتورهای آن‌ها یافت می شود. نقش آنزیمی برای این دمین در پروتئین‌های گیاهی حامل آن مشاهده شده است که می‌تواند همانند هم‌خانواده‌های خود در پروتئین های حیوانی سبب هیدرولیز NAD+ شود و این فعالیت NADase برای تقویت پیام‌های ایمنی‌زایی در برابر بیمارگرها ضروری است (Bayless & Nishimura, 2020, Wang *et al.*, 2019, Horsefield *et al.*, 2019).

1- Leucine-Rich Repeat-Containing Protein
2- Nucleotide-binding (NB) Leucine-rich repeat (LRR) Receptor
3- Oligomerization Domain
4- C-terminal LRR domain
5- Coiled coil (CC)–NLRs
6 - Toll Interleukin-1 Receptor (TIR)–NLRs
7- Toll-Like Receptors

دمین NB-ARC در پروتئین‌های حامل ان در سلوی‌های جانوری مرگ سلولی را تنظیم می‌کند (van der Biezen & Jones, 1998). بررسی‌های ساختاری این دمین در یک پروتئین آپوپتوز انسانی به نام (Apaf-1[1]) نشان داده‌است که این دمین حامل سه لایه از پیچش‌های α-β است که به یک منطقه چرخش α منتهی می‌شود که از ویژگی خانواده بزرگ دمین‌های AAA+ ATPase به شمار می‌رود. این دمین قابلیت باندشدن با ATP را دارا می‌باشد. پیش‌بینی شده است که اتصال ATP توسط این دمین و هیدرولیز آن توسط دمین TIR می‌تواند به بروز تغییرات ساختاری منتج شود. این تغییرات می‌توانند به شکل‌گیری آپوتوز در نتیجه دریافت سیگنال منتهی شود (Riedl *et al.*, 2005). دمین LRR در انتهای C پروتئین‌های NLR گیاهی قرار گرفته است و از تکرارهای غنی از لوسین از ۲ تا ۴۵ موتیف ۲۰ تا ۳۰ اسیدآمینه‌ای تشکیل شده‌اند که به شکل یک کمان یا نعل اسب آرایش می‌گیرند (Enkhbayar *et al.*, 2004). این مجموعه یک چهارچوب ساختاری را برای شکل‌گیری برهمکنش پروتئین‌ها فراهم می‌نماید (Enkhbayar *et al.*, 2004).

آنالیز فرآیندهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13 احتمال ارتباط این پروتئین با چندین مسیر پیام‌رسانی مرتبط با مسیرهای دفاعی را در گیاه نشان داد. یکی از این مسیرها، مسیر پیام‌رسانی تنظیم‌کننده پاسخ‌های ایمنی[2] با شماره بازیابی (GO:0002764) است. این مسیر یک فرآیند آبشاری به شمار می‌رود که با برهمکنش یک عامل با گیرنده آغاز می‌شود و تغییراتی را در سطح فعالیت یک RNA پیام‌رسان یا اهداف پائین دست دیگری را سبب می‌شود و سرانجام به فعال‌سازی، تداوم و یا مهار یک پاسخ ایمنی در گیاه منتج می‌شود (Lanier, 2005). مسیر پیام‌رسانی مبتنی بر سالیسیلیک‌اسید (SA)[3] (GO:0009863) یکی دیگر از مسیرهای مرتبط با پروتئین MRGH13 معرفی شده است. هورمون SA یک هورمون کلیدی در ایمنی ذاتی گیاه[4] شامل مقاومت موضعی و سیستمی در برابر حملات عوامل زیستی و پاسخ‌های فوق‌حساسیت و مرگ سلولی به شمار می رود (Ding & Ding, 2020). این دو مسیر کاملا با کارکرد پیش-بینی شده برای پروتئین MRGH13 منطبق است و با کارکرد دمین-های مشخص‌شده در این پروتئین در ارتباط است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با بررسی تعدادی از صفات ظاهری ارقام استاندارد ملون با سطوح مقاومتی مختلف در برابر قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی، توصیف ظاهری کاملی از این ارقام به‌دست آمد. به‌منظور دست‌یابی به نشانگرهای مولکولی جهت گزینش منابع مقاومت به بیماری‌ها منطقه در برگیرنده گروه لینکاژی حامل ژن‌های *MRGH21* در داده های ژنومی انجام شد و با استفاده از ردیابی ژن *MRGH13* با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی امکان تمایز ارقام Charentais Fom1 و BG-5384 با حضور یک تک باند مهیا شد.

آنالیز توالی پروتئین کدشونده توسط ژن *MRGH13* نشان داد این پروتئین به‌عنوان عضوی از خانواده پروتئینی حامل توالی‌های تکراری غنی از لوسین دربرگیرنده دمین‌های TIR، NB-ARC و LRR می‌باشد که کارکردهای مرتبط با مسیر دفاعی گیاهی نشان می‌دهند. بررسی مسیرهای زیستی مرتبط با پروتئین MRGH13 نیز نشان داد که این پروتئین می‌تواند در مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی گیاه دخیل باشد. با توجه به نقش پیام‌رسانی این پروتئین، انجام مطالعات آتی برای شناسایی برهمکنش آن با دیگر پروتئین‌های ملون می‌تواند در شناخت نقش آن در مقاومت مؤثر باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و مدیریت پژوهشکده علوم گیاهی برای مهیا نمودن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در انجام این پژوهش سپاسگزاری نمایند. ضمناً بودجه انجام این تحقیق از محل اعتبار اختصاص‌یافته به طرح شماره ۱۸۹۴۸ توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین شده است.

1- Protease-activating factor 1
2- Immune Response-Regulating Signaling Pathway
3- Salicylic Acid Mediated Signaling Pathway
4- Plant Innate Immunity

References

1. Abbaspour, N., & Shokouhifar, F. (2012a). *Detection of resistance gene homologous in number of melon cultivars*. In: 12th Iraninan Genetics Congeres. university of Shahid Beheshti international Hall, Tehran: Iranian Genetics Society, 1-6.
2. Abbaspour, N., & Shokouhifar, F. (2012b). *Detection, amplification and sequencing of a part of the MRGH21 gene in Khatuni melon*. In: Third National Conference on Agricultural Biotechnology.
3. Ajuru, M.G., & Okoli, B.E. (2013). The morphological characterization of the melon species in the family cucurbitaceae Juss., and their utilization in Nigeria. *International Journal of Modern Botany, 3*, 15-19. https://doi/10.5923/j.ijmb.20130302.01
4. Alvarez, J.M., González-Torres, R., Mallor, C., & Gómez-Guillamón, M.L. (2005). Potential sources of resistance to Fusarium wilt and powdery mildew in melons. *HortScience, 40*, 1657-1660. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.6.1657
5. Armstrong, G., & Armstrong, J. (1978). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of the cucurbitaceae. https://doi.org/10.1094/phyto-68-19
6. Bayless, A.M., & Nishimura, M.T. (2020). Enzymatic functions for Toll/interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system. *Frontiers in Genetics, 11*, 539. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00539
7. Benoit, F. (1974). The Fusarium problem in melon growing in Belgium and the relative value of certain rootstocks. *Tuinbouwerichten (Belgium), 38*, 16-20.
8. Brotman, Y., Normantovich, M., Goldenberg, Z., Zvirin, Z., Kovalski, I., Stovbun, N., Doniger, T., Bolger, A.M., Troadec, C., Bendahmane, A., & Cohen, R. (2013). Dual resistance of melon to *Fusarium oxysporum* races 0 and 2 and to Papaya ring-spot virus is controlled by a pair of head-to-head-oriented NB-LRR genes of unusual architecture. *Molecular Plant, 6*, 235-238. https://doi.org/10.1093/mp/ssr096
9. Castanera, R., Ruggieri, V., Pujol, M., Garcia-Mas, J., & Casacuberta, J. M. (2020). An improved melon reference genome with single-molecule sequencing uncovers a recent burst of transposable elements with potential impact on genes. *Frontiers in Plant Science, 10*, 1815. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01815
10. Chenarani, Z., Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Farrokhi, N. (2012). *Study the effects of explant and medium types in direct regeneration induction in melon (Cucumis melo L., cv. Khatooni).* In: 12th Iranian Genetics Congress. Tehran.
11. Chikh-Rouhou, H., Álvarez, J., & González-Torres, R. (2007). Differential interaction between melon cultivars and race 1.2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 72*, 825-829.
12. Chikh-Rouhou, H., González-Torres, R., Alvarez, J.M., & Oumouloud, A. (2010). Screening and morphological characterization of melons for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2. *HortScience, 45*, 1021-1025. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.7.1021
13. Chikh-Rouhou, H., González Torres, R., Alvarez, J., & Pitrat, M. (2008). Characterization of the resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in *Cucumis melo* 'BG-5384. In Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France).
14. Chilosi, G., Reda, R., Aleandri, M.P., Camele, I., Altieri, L., Montuschi, C., Languasco, L., Rossi, V., Agosteo, G.E., Macrì, C., & Carlucci, A. (2008). Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy. *EPPO Bulletin, 38*, 147-154. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01200.x
15. Chupp, C. (1930). Fusarium wilt of muskmelon. *Plant Dissese Report, 14*, 160.
16. Consortium, G.O. (2015). Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic Acids Research, 43*, D1049-D1056. https://doi.org/10.1093/nar/gku1179
17. Dangl, J.L., Horvath, D.M., & Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science, 341*, 746-751. https://doi.org/10.1126/science.1236011
18. Deokar, A., Sagi, M., & Tar'an, B. (2019). Genome-wide SNP discovery for development of high-density genetic map and QTL mapping of ascochyta blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics, 132*, 1861-1872. https://doi.org/10.1007/s00122-019-03322-3
19. Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in Plant Science, 25*, 549-565. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004
20. Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochemical Bulletin, 19(1)*, 11-15.
21. Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., & Matsushima, N. (2004). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 54*, 394-403. https://doi.org/10.1002/prot.20144
22. Food and agriculture organization of the United Nations, FAO. (2017). FAOSTAT database. FAO-ESS Rome, Italy. http://www.fao.org/faostat

23. Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V.M., Hénaff, E., Câmara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., & Alioto, T. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*, 11872-11877. https://doi.org/10.1073/pnas.12054151
24. Garcia-Mas, J., van Leeuwen, H., Monfort, A., de Vicente, M.C., Puigdomènech, P., & Arus, P. (2001). Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon. *Plant Science*, *161*, 165-172. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00403-4
25. González, V.M., Aventín, N., Centeno, E., & Puigdomènech, P. (2014). Interspecific and intraspecific gene variability in a 1-Mb region containing the highest density of NBS-LRR genes found in the melon genome. *BMC Genomics*, *15*, 1131. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1131
26. Herman, R., & Perl-Treves, R. (2007). Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in *Cucumis melo*. *Plant Disease*, *91*(9), 1180-1186. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1180
27. Horsefield, S., Burdett, H., Zhang, X., Manik, M.K., Shi, Y., Chen, J., Qi, T., Gilley, J., Lai, J.S., Rank, M.X., & Casey, L.W. (2019). NAD+ cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways. *Science*, *365*, 793-799. https://doi.org/10.1126/science.aax1911
28. IPGRI, (International Plant Genetic Resources Institute). (2003). Descriptors for melon (*Cucumis melo* L.). Rome, Italy.
29. Islam, M.R., Hossain, M.R., Jesse, D.M.I., Jung, H.J., Kim, H.T., Park, J.I., & Nou, I.S. (2020) Characterization, identification and expression profiling of genome-wide R-genes in melon and their putative roles in bacterial fruit blotch resistance. *BMC genetics*, *21*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s12863-020-00885-9
30. Jiang, G.-L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, *3*, 45-83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22521-0_15
31. Joobeur, T., King, J.J., Nolin, S.J., Thomas, C.E., & Dean, R.A. (2004). The fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal*, *39*, 283-297. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02134.x
32. Kantoğlu, K.Y., Seçer, E., Erzurum, K., Tutluer, İ., Kunter, B., Peşkircioğlu, H., & Sağel, Z. (2010). Improving tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in melon using tissue culture and mutation techniques. kurumsalarsiv.tenmak.gov.tr
33. Kourelis, J., & van der Hoorn, R.A.L. (2018). Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*, *30*, 285-299. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579
34. Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*, *23*, 225-274. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
35. Leach, J. (1933). A destructive Fusarium wilt of muskmelon. *Journal of Agriculture Research*, *23*, 556-559.
36. Leary, J., JV, L., & WD, W. (1976). Identification of the races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing wilt of muskmelon in California. https://doi.org/10.1094/phyto-66-15
37. Lian, Q., Fu, Q., Xu, Y., Hu, Z., Zheng, J., Zhang, A., He, Y., Wang, C., Xu, C., Chen, B., & Garcia-Mas, J. (2021). QTLs and candidate genes analyses for fruit size under domestication and differentiation in melon (*Cucumis melo* L.) based on high resolution maps. *BMC Plant Biology*, *21*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s12870-021-02904-y
38. Luck, J.E., Lawrence, G.J., Dodds, P.N., Shepherd, K.W., & Ellis, J.G. (2000). Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *The Plant Cell*, *12*, 1367-1377. https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1367
39. Maekawa, T., Kufer, T.A., & Schulze-Lefert, P. (2011). NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology*, *12*, 817-826. https://doi.org/10.1038/ni.2083
40. Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR–encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *15*, 809-834. https://doi.org/10.1105/tpc.009308
41. Miccolis, V., & Saltveit, M.E. (1991). Morphological and physiological changes during fruit growth and maturation of seven melon cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *116*, 1025-1029. https://doi.org/10.21273/jashs.116.6.1025
42. Monforte, A., Garcia-Mas, J., & Arús, P. (2003). Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding*, *122*, 153-157. https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00848.x
43. Morata, J., & Puigdomènech, P. (2017). Variability among Cucurbitaceae species (melon, cucumber and watermelon) in a genomic region containing a cluster of NBS-LRR genes. *BMC Genomics*, *18*, 138. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3529-5
44. Oumouloud, A., El Otmani, M., & Álvarez, J. (2015). Molecular characterization of Fom-1 gene and development of functional markers for molecular breeding of resistance to Fusarium race 2 in melon. *Euphytica*, *205*, 491-501. https://doi.org/10.1007/s10681-015-1420-5

45. Oumouloud, A., Torres, R.G., Garcés-Claver, A., Chikh-Rouhou, H., & Alvarez, J. (2013). Differential response of *Cucumis melo* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 isolates. *Crop protection, 44*, 91-94. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.001
46. Pitrat, M. (2008) Melon. In: *Vegetables I.* Springer, pp. 283-315. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_9
47. Quiot, J., JB, Q., & KG, S. (1979). Fréquence des principales viroses identifiées dans une exploitation maraîchère du Sud-Est de la France.
48. Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R., & Shi, Y. (2005). Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature, 434*, 926-933. https://doi.org/10.1038/nature03465
49. Risser, G., & DW, D. (1976) A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f .sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. https://doi.org/10.1094/phyto-66-1105
50. Ruggieri, V., Alexiou, K.G., Morata, J., Argyris, J., Pujol, M., Yano, R., Nonaka, S., Ezura, H., Latrasse, D., Boualem, A., & Benhamed, M. (2018). An improved assembly and annotation of the melon (*Cucumis melo* L.) reference genome. *Scientific Reports*, 8 8088. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26416-2
51. Shokouhifar, F., Mamarabadi, M., & Khyrabad, M.M. (2016). Tracking of the gene Fom2 and study on the genetic diversity of NB-ARC domain in the number of resistant and sensitive melon cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (race 1). *Australasian Plant Pathology, 45*, 279-288. https://doi.org/10.1007/s13313-016-0408-5
52. Singh, R., Kumar, K., Purayannur, S., & Verma, P. K. (2023). Genomics-assisted genetics of complex regions from chickpea chromosome 4 reveals two candidate genes for Ascochyta blight resistance. *Plant Science, 334*, 111781. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111781
53. Sobhani, A., Bashteni, E., Rafezi, R., Heidarpour, A., & Gharib, M. (2015). Khatooni 93, a new melon cultivar suitable for cultivation in temperate warm areas of Iran. *Research Achivments for Field and Horticulture Crops, 4*, 117-126. https://doi.org/10.22092/rafhc.2016.109501
54. Soltani, F., Shajari, M., Mirbehbahani, G.S., & Bihamta, M.R. (2022). Assessment of melon genetic diversity based on fruit phenotypic traits and flowering habits. *International Journal of Horticultural Science and Technology, 9*, 97-116. https://doi.org/10.22059/ijhst.2021.313939.415
55. Stepansky, A., Kovalski, I., & Perl-Treves, R. (1999). Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution, 217*, 313-332. https://doi.org/10.1007/bf00984373
56. Sudheesh, S., Kahrood, H.V., Braich, S., Dron, N., Hobson, K., Cogan, N.O., & Kaur, S. (2021). Application of genomics approaches for the improvement in ascochyta blight resistance in chickpea. *Agronomy, 11*, 1937. https://doi.org/10.3390/agronomy11101937
57. Szamosi, C., Solmaz, I., Sari, N., & Bársony, C. (2010). Morphological evaluation and comparison of Hungarian and Turkish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. *Scientia Horticulturae, 124*, 170-182. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.024
58. Teimouri, S., Rahnama, K., Hajian Shahri, M., & Afzali, H. (2013). Identification, distribution and pathogenicity of Fusarium species isolated from root and crown of cantaloupe and melon in Khorasan Razavi province (In Persian), 35-46.
59. Traband, R.C., Wang, X., Lui, J., Yu, L., Hiraoka, Y., Herniter, I.A., Bowman, C., Resendiz, M., Wang, Z., Knowles, S.P., & Lo, S. (2023). Exploring the phylogenetic relationship among citrus through leaf shape traits: A morphological study on citrus leaves. *Horticulturae, 9*, 793. https://doi.org/10.3390/horticulturae9070793
60. Udoh, L.I., Obaseojei, W.P., & Uzoebo, C. (2021). Single nucleotide polymorphisms: a modern tool to screen plants for desirable traits. In: *Plant Breeding-current and Future Views.* https://doi.org/10.5772/intechopen.94935
61. van der Biezen, E.A., & Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology, 8*, R226-R228. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70145-9
62. Van der Hoorn, R.A., Kruijt, M., Roth, R., Brandwagt, B.F., Joosten, M.H., & De Wit, P.J. (2001). Intragenic recombination generated two distinct Cf genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*, 10493-10498. https://doi.org/10.1073/pnas.181241798
63. van Leeuwen, H., Garcia-Mas, J., Coca, M., Puigdoménech, P., & Monfort, A. (2005). Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. *Molecular Genetics and Genomics, 273*, 240-251. https://doi.org/10.1007/s00438-004-1104-7
64. Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Wang, H.W., & Zhou, J.M. (2019). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, 364, eaav5868. https://doi.org/10.1126/science.aav5868
65. Zheng, X., & Wolff, D. W. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA markers linked to fusarium wilt resistance in diverse melons. *HortScience, 35*, 716-721. https://doi.org/10.21273/hortsci.35.4.716

66. Zink, F. (1985). Inheritance of resistance in muskmelon to Fusarium wilt. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *110*, 600-604. https://doi.org/10.21273/jashs.110.5.600
67. Zink, F., & Thomas, C. (1990). Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0, 1 and 2 in muskmelon line MR-1. *Phytopathology*, *80*, 1230-1232. https://doi.org/10.1094/phyto-80-1230

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 599-610

Effect of Different Rootstocks on Morphological, Phytochemical and Molecular Indicators of 'Thomson Navel' Orange Fruit at Commercial Maturity

F. Ahmadi[1*], M.M. Sharifani[2], A. Mousavi[3], N. Akhlaghi Amiri[4], M. Khoshhal Sarmast[2], Kh. Zaynali Nezhad[5]

1 and 2- Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
([*]- Corresponding Author Email: Fatemeh.Ahmadi_s96@gau.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Horticulture Crops Research, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran
5- Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 12-02-2024
Revised: 11-04-2024
Accepted: 05-05-2024
Available Online: 06-05-2024

How to cite this article:
Ahmadi, F., Sharifani, M.M., Mousavi, A., Akhlaghi Amiri, N., Khoshhal Sarmast, M., & Zaynali Nezhad, Kh. (2023). Effect of different rootstocks on morphological, phytochemical and molecular indicators of 'Thomson Navel' orange fruit at commercial maturity. *Journal of Horticultural Science, 38*(3), 599-610. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86813.1326

Introduction

External and internal quality of citrus such as color, shape and taste increase economic benefit. The vigour of each rootstock causes qualitative and quantitative change and the effective factor on commercial maturity, which is important for gardeners and producers. Considering the characteristics of the fruit in grafted trees, the present research was conducted with the aim of evaluating the effects of trifoliate orange, Citrange and Citrumelo rootstocks on some morphological, phytochemical and molecular traits of 'Thomson Navel' orange fruit.

Materials and Methods

This research was carried out in 2018 at Ghaemshahr Horticultural Research Station, Mazandaran. It was conducted in the form of randomized complete block design (RCBD) of uniform and 10-year-old 'Thomson Navel' orange grafted on 'trifoliate orange', 'Citrange' and 'Citrumelo' rootstocks with four replications. The samples were collected at the end of October and were transferred to the research laboratory of Horticulture Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources for further research. Measurements were made on the morphological traits, quality characteristics of the fruit, the phenolic compounds of the peel and the pulp of the fruit and relative expression of fruit pulp *sucrose phosphate synthase1* gene. Data variance analysis was done using SAS software (version 9.0). Mean comparisons were done with Duncan's multiple range test.

Results and Discussion

The results of analysis of variance showed that the rootstock effect on traits of length-to-diameter ratio, weight and density of 'Thomson Navel'orange was significant at the five percent probability level ($p \leq 0.05$) and the fruit length and diameter traits were significant at the one percent probability level ($p \leq 0.01$). The results of mean comparison showed that the characteristics of length, diameter, length-to-diameter ratio, weight and density of 'Thomson Navel' orange at commercial maturity on the trifoliate orange rootstock were more than the two other rootstocks. Due to the early harvest, the density of the fruit was recorded lower than one, so that the highest amount (0.5 g per cm^3) was observed in the rootstock of trifoliate orange however it was not significantly different from

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86813.1326

Citrange rootstock. Based on the results of analysis of variance, it showed that the effect of rootstock on total soluble solids was significant at the level of five percent. Also, the rootstock had a significant effect on titratable acidity, taste index, vitamin C, acidity, EC and total sugar at the level of one percent. However, the amount of vitamin C was higher in the Citrumelo rootstock. The highest amount of acidity and EC belonged to trifoliate orange rootstock and the lowest amount belonged to Citrange rootstock. The highest amount of total sugar was observed in the dwarfing trifoliate orange rootstock, while its lowest amount was recorded in the vigorous Citrumelo rootstock. The highest amount of total soluble solids was observed at the rootstock of the trifoliate orange. The amount of titratable acid in the Citrange rootstock was higher than the other two rootstocks. The taste index was higher in the trifoliate orange rootstock than the other rootstocks. According to the results of analysis of variance, the rootstock effect on the index of total phenol of fruit peel and pulp and total flavonoid of fruit peel was significant at the five percent probability level ($p \leq 0.05$) and only on the antioxidant activity of the fruit peel at the statistical level of one percent ($p \leq 0.01$). Also, there was no significant difference in total flavonoid traits and antioxidant activity of fruit pulp. The highest amount of total phenolic, total flavonoid and percentage of antioxidant activity was found in the trifoliate orange rootstock. Also, between the fruit organs, phenolic compounds were recorded more in the fruit peel compare to the fruit pulp. The peel of orange is more exposed to ultraviolet rays and changes in environmental conditions, Therefore more secondary metabolites accumulate in that part of the plant. The highest relative expression of fruit pulp *sucrose phosphate synthase1* gene was obtained in the Citrange rootstock.

Conclusion

The vigor of different citrus rootstocks caused the dwarf trees to have a higher accumulation rate of phytochemical indices than the vigorous trees. The trifoliate orange rootstock is suitable for fresh consumption due to the early commercial maturity of the fruit. Fruit peel rich in phenolic compounds is used for medicinal purposes. The technical knowledge from this research will be useful for citrus producers in East Mazandaran.

Keywords: Commercial maturity, Fruit size, Phenolic compounds, Rootstock, *SPS* gene

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۵۹۹-۶۱۰

بررسی اثر پایه‌های مختلف بر شاخص‌های ریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' در زمان بلوغ تجاری

فاطمه احمدی[۱*]- محمد مهدی شریفانی[۲]- امیر موسوی[۳]- نگین اخلاقی امیری[۴]- مصطفی خوشحال سرمست[۲]- خلیل زینلی‌نژاد[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۶

چکیده

کیفیت بیرونی و درونی مرکبات از قبیل رنگ، شکل و طعم موجب افزایش سود اقتصادی می‌گردد. قدرت رشدی پایه نیز سبب تغییرات کمی و کیفی و عامل مؤثر بر زمان بلوغ تجاری میوه می‌باشد که برای باغداران و تولیدکنندگان حائز اهمیت است. با توجه به ویژگی‌های میوه در درختان پیوندی، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سه پایه مختلف مرکبات بر برخی صفات ریخت‌شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی میوه پرتقال 'تامسون ناول' صورت گرفت. این تحقیق در سال ۱۳۹۸ در ایستگاه تحقیقات باغبانی قائم‌شهر، مازندران در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با درختان یکنواخت و ۱۰ ساله پرتقال 'تامسون‌ناول' پیوند شده روی سه پایه 'پونسیروس'، 'سیترنج' و 'سیتروملو' در چهار تکرار انجام شد. نمونه‌ها در اواخر مهرماه جمع‌آوری شده و به‌منظور ادامه تحقیقات به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند. اندازه‌گیری روی صفات ریخت‌شناسی، ویژگی‌های کیفی و ترکیبات فنلی میوه و نیز بیان نسبی ژن ساکارزفسفات‌سنتاز صورت گرفت. نتایج نشان داد که صفات طول، قطر، نسبت طول به قطر، وزن و چگالی میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' در زمان بلوغ تجاری روی پایه 'پونسیروس' نسبت به دو پایه دیگر میزان بیشتری داشت. در حالی‌که میزان ویتامین ث در پایه 'سیتروملو' بالاتر بود. بیشترین میزان اسیدیته و EC متعلق به پایه 'پونسیروس' و کمترین میزان آن متعلق به پایه 'سیترنج' بود. میزان قندکل و مواد جامد محلول در پایه پاکوتاه 'پونسیروس' بالاتر از سایر پایه‌ها مشاهده شد در حالی‌که کمترین میزان آن‌ها در پایه پابلند 'سیتروملو' ثبت گردید. اسیدیته قابل تیتراسیون و بیان نسبی ژن *CitSPS1* در پایه 'سیترنج' نسبت به دو پایه دیگر بالاترین مقدار بود. بیشترین میزان فنل‌کل، فلاونوئیدکل و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پایه 'پونسیروس' وجود داشت. قدرت رشدی پایه‌های مختلف مرکبات سبب شد که درختان پاکوتاه نسبت به درختان پابلند، میزان انباشت شاخص‌های فیتوشیمیایی بالاتری داشته باشند. به‌طور کلی پایه 'پونسیروس' به‌دلیل بلوغ تجاری زودرس میوه از توان مناسبی برای تازه‌خوری برخوردار گردید.

واژه‌های کلیدی: اندازه میوه، بلوغ تجاری، پایه، ترکیبات فنلی، ژن ساکارزفسفات‌سنتاز

مقدمه

کشور ایران از نظر تولید مرکبات در رتبه نهم جهانی قرار دارد (Citrus Word Statistics, 2022). استان مازندران با بیش‌از ۱۲۰ هزار هکتار سطح زیر کشت، جایگاه نخست در کشور را دارد به‌طوری که ۷۵ درصد سطح زیر کشت مرکبات شمال ایران به پرتقال اختصاص یافته است. پرتقال با نام علمی *Citrus sinensis* متعلق به تیره سدابیان[۲] می‌باشد (Swingle & Reece, 1967). رقم تامسون ناول در گروه پرتقال نافدار بوده و از تنوع شکلی و رنگی بالایی

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Fatemeh.Ahmadi_s96@gau.ac.ir)
۳- دانشیار گروه پژوهشی زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۴- استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ساری، ایران
۵- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86813.1326
2- Rutaceae

برخوردار است. این رقم تجاری، زودرس و دوره رسیدن آن نه‌ماه است (Fotouhi Ghazvini & Fattahi Moghadam, 2007). افزون‌بر پیوندک، پایه بر صفاتی از قبیل اندازه درخت، عملکرد، شاخص برداشت و نیز کیفیت میوه مرکبات تأثیر می‌گذارد (Oustric *et al.*, 2017; Macia-Vezquez *et al.*, 2024). در بین ویژگی‌های پایه های مرکبات، پایه پیوندی پونسیروس[1] پاکوتاه با حجم تاج کوچک بوده ولی پایه سیترنج[2] نیمه‌پاکوتاه دارای حجم تاج کوچک تا متوسط و پایه سیتروملو[3] پابلند، پررشد و دارای حجم تاج متراکم است (Castle ; Fattahi Moghadam, 2007& Fotouhi Ghazvini *et al.*, 2010). بنابراین بررسی خصوصیات ترکیب پایه و پیوندک برای تغییر زمان برداشت رایج، راندمان محصول و عملیات باغداری ضروری بوده است. از این رو، یکی از سؤالات مطرح در عرصه کشت و پرورش مرکبات این است که آیا پایه با توجه به شاخص‌های ریخت شناسی، فیتوشیمیایی و مولکولی تأثیری بر کیفیت بیرونی و درونی در زمان بلوغ تجاری میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' دارد؟ چرا که صفاتی نظیر ابعاد، رنگ و وزن میوه به‌طور مستقیم بر بازارپسندی و میزان فروش محصول مؤثر هستند و نیز نسبت مواد جامد محلول به اسیدیته‌کل میوه به‌عنوان شاخص قابلیت خوراکی و حد استاندارد مرکبات در نظر گرفته می‌شود (Fattahi Moghaddam *et al.*, 2016). ژن ساکارزفسفات‌سنتاز[4] (*CitSPS*) از جمله ژن‌های کلیدی است که در انباشت ساکارز ایفای نقش می‌کند (Yamaki, 2010). بیشترین ارزش غذایی مرکبات در میزان ویتامین ث شناخته شده است. با مصرف یک عدد پرتقال متوسط، ۱۳۰ درصد از نیاز روزانه بدن به این ویتامین برطرف می‌گردد. ویتامین ث در سلامتی انسان، کاهش خطر بیماری قلبی عروقی، تصلب شریان و در درمان برخی از سرطان‌ها مفید است (Sarkar *et al.*, 2009). علاوه‌بر اهمیت صفات مذکور، در مراحل رشد میوه مرکبات بخش زیادی از انرژی گیاه به میوه انتقال می‌یابد اما انباشت آن در بخش‌های مختلف فلیودو، آلبدو و گوشت متفاوت است (Kato *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2002). از سویی دیگر، پوست میوه مرکبات دارای غده‌های روغنی بوده که محل انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Hemmati *et al.*, 2015). در مقابل برخی فاکتورها مانند مواد جامد محلول در گوشت میوه بیشترین میزان را به خود اختصاص می‌دهد. در هر صورت نوع پایه و پیوندک نقش عمده‌ای در بیوسنتز متابولیت‌های گیاهی، بیان ژن‌های درگیر و نیز روند پیشرفت رنگ میوه دارند (Mashayekhi *et al.*, 2014).

در بسیاری از ارقام زودرس مرکبات، پیش از رنگ‌گیری پوست میوه، بخش خوراکی آن به بلوغ تجاری می‌رسد. به همین دلیل، قبل از اینکه پوست آن‌ها به‌طور کامل تغییر رنگ دهد قابلیت آبگیری دارند و شاخص طعم میوه نسبت به‌رنگ پوست در آن معتبرتر است (Akhlaghi Amiri & Asadi Kangarshahi, 2022). وضعیت رشدی درخت در تعیین رنگ میوه دخیل است به‌طوری‌که در درختان با رشد زیاد و قوی، سطح پوست میوه کم‌رنگ‌تر است (Aguilar-Hernandez *et al.*, 2020). سبززدایی در مرکبات با استفاده از اتیلن یا اتفن انجام می‌شود که در طی آن، رنگ سبز کلروفیل پوست تجزیه شده و در مقابل رنگدانه‌های زرد و نارنجی آشکار می‌شوند (Peng *et al.*, 2013; Mesejo *et al.*, 2021). به‌طور طبیعی، فرآیند بلوغ تجاری میوه همراه با تبدیل کلروپلاست به کروموپلاست اتفاق می افتد که این تغییر رنگ سطح پوست ناشی از زوال تصاعدی کلروفیل، افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و تولید کاروتنوئید است. انباشت کربوهیدرات موجب تحریک این فرآیند می‌گردد (Iglesias *et al.*, 2007). از این حیث، امتیاز تولید میوه نوبرانه در عرضه به بازار رقابتی با استفاده از شاخص بلوغ تجاری میوه مهیا است. بر همین اساس، هدف از تحقیق حاضر شناخت برخی ویژگی‌های پرتقال 'تامسون ناول' تحت تأثیر سه پایه مرکبات در مراحل پایانی رشد و تعیین تأثیر پایه‌ها بر زمان بلوغ تجاری میوه است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' روی سه پایه 'پونسیروس'، 'سیترنج' و 'سیتروملو' از درختان یکنواخت و ۱۰ ساله در اواخر مهرماه سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. این باغ واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی قائم‌شهر، وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۷ دقیقه شمالی است. به‌منظور ادامه تحقیقات، نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند. آنالیز خاک مکان اجرای پژوهش در (جدول ۱) آورده شده است.

1- Trifoliate orange (*Poncirus trifoliate*)
2- Citrange (*P. trifoliata* × *C. sinensis*)
3- Citrumelo (*P. trifoliata* × *C. paradise*)
4- Sucrose phosphate synthase

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک ایستگاه تحقیقات باغبانی قائم‌شهر، مازندران

Table 1- Characters of physicochemical soil in Ghaemshahr Horticultural Research Station, Mazandaran

عمق Depth (cm)	بافت خاک Soil texture	کربن آلی Organic carbon (%)	نیتروژن Nitrogen (%)	فسفر Phosphorus ($mg.kg^{-1}$)	پتاسیم Potassium ($mg.kg^{-1}$)	اسیدیته pH	هدایت‌الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$)
0-30	لوم Loam	1.00	0.084	15.2	116.7	7.49	0.35
30-60	لوم Loam	0.32	0.026	8.0	51.7	7.64	0.79

صفات ریخت‌شناسی

طول و قطر میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' پس از برداشت توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری وزن میوه با ترازوی دیجیتالی با دقت یک صدم انجام شد. برای تعیین حجم میوه، درون استوانه‌ای مدرج تا ارتفاع معین آب ریخته شد، سپس میوه در آب غوطه‌ور شد. با توجه به میزان جابه‌جایی آب، حجم نمونه محاسبه گردید. تعیین چگالی میوه از تقسیم وزن میوه بر حجم میوه و بر حسب گرم بر سانتی‌متر مکعب انجام شد.

ویژگی‌های کیفی

به‌منظور ارزیابی صفات مواد جامد محلول، اسیدیته قابل تیتراسیون، شاخص طعم، ویتامین ث، اسیدیته و EC میوه پرتقال 'تامسون‌ناول'، ابتدا میوه‌ها آبگیری شدند سپس عصاره‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد جامد محلول

برای اندازه‌گیری مواد جامد محلول، یک قطره عصاره میوه روی صفحه دستگاه رفرکتومتر (مدل ABBE، ساخت بلژیک) ریخته شد و غلظت املاح مواد جامد محلول بر حسب درصد بریکس ثبت گردید (Cherng & Ouyang, 2003).

اسیدیته قابل تیتراسیون

اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتراسیون با روش تیتراسیون انجام شد. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر آب میوه با ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد. سپس دو قطره فنل‌فتالئین (یک درصد) به محلول افزوده و با هیدروکسید سدیم تیتر شد. نقطه پایانی تیتر زمانی در نظر گرفته شد که رنگ صورتی نمایان گردید. میزان اسیدیته قابل تیتراسیون بر حسب میلی گرم اسید سیتریک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه محاسبه گردید (Fallahi, 1990).

شاخص طعم

از تقسیم مواد جامد محلول بر اسیدیته قابل تیتراسیون، شاخص طعم محاسبه گردید.

ویتامین ث

به‌منظور تعیین محتوی ویتامین ث عصاره از روش تیتراسیون استفاده شد. ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر از آب میوه با ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد و دو قطره نشاسته (۰/۵ درصد) به محلول فوق اضافه گردید. سپس این ترکیب با محلول ید تیتر شد. تیتراسیون تا زمانی‌که رنگ آبی در عصاره مشاهده شد ادامه یافت. میزان ویتامین ث بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه محاسبه گردید (Skinner,1997).

اسیدیته

اندازه‌گیری اسیدیته با قرار گرفتن سنسور دستگاه pH متر در عصاره صورت گرفت (Mashayekhi & Atashi, 2017).

EC

تعیین EC عصاره با کمک EC متر و بر حسب میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر محاسبه شد (Mashayekhi & Atashi, 2017).

قند کل

جهت استخراج قندکل از روش مکردی و همکاران (Mccready *et al.*, 1950) استفاده شد. در گام نخست ۱۰۰ میلی‌گرم از گوشت میوه تهیه شده با پنج میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. سپس در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ده دقیقه قرار داده و بعد از آن عصاره‌ها با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، مواد روشناور داخل شیشه مکارتی ریخته و عمل فوق سه مرتبه تکرار گردید. عصاره جمع‌آوری شده در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اتانول به‌طور کامل تبخیر گردید. بعد از خشک شدن اتانول، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه شد تا مواد قندی در آن به‌طور کامل حل شدند. در گام بعدی، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره قندی تهیه شده با سه میلی‌لیتر معرف آنترون ترکیب شد و پس از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن در بن‌ماری

۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. میزان قندکل بر اساس منحنی استاندارد قندکل برآورد شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

فنل کل

محتوی فنل‌کل با استفاده از معرف فولین–سیوکالتیو و با استفاده از روش اندازه‌گیری کیم و همکاران (Kim *et al.*, 2004) انجام شد. نیم‌گرم از پوست و گوشت میوه با پنج میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد هموژنیزه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین ترکیب شدند. بعد از گذشت پنج دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم (یک مولار) به محلول اضافه شد تا واکنش خنثی گردید و پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UNICO 2800، ساخت آمریکا) خوانده شدند. محتوی فنل‌کل بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه گردید.

فلاونوئید کل

برای تعیین محتوی فلاونوئید کل، از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. در گام اول نیم‌گرم از پوست و گوشت میوه با پنج میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد و در گام بعدی ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینوم (۱۰ درصد)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم (یک مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با کمک اسپکتروفتومتر قرائت شدند. محتوی فلاونوئیدکل بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن تر با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به‌دست آمد (Chang *et al.*, 2002).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور محاسبه درصد مهار رادیکال آزاد یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش بلویس (Blois, 1958) مورد استفاده شد. یک میلی‌لیتر عصاره گیاهی با یک میلی‌لیتر معرف DPPH درون لوله آزمایش ریخته شد. سپس لوله‌های آزمایش حاوی محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند تا اثر بخشی مهار رادیکالی توسط DPPH صورت پذیرد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی= [(جذب کنترل– جذب نمونه)/ جذب کنترل] × ۱۰۰

بیان ژن

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از گوشت میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' با استفاده از کیت تریازول صورت گرفت. سپس ارزیابی کیفی RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. به‌منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از RNAهای استخراجی، تیمار آنزیم DNaseI انجام گرفت. پس از اطمینان از کیفیت، سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری سیناکلون صورت گرفت.

آغازگرهای اختصاصی ژن *CitSPS1* و ژن *CitActin* به‌عنوان کنترل داخلی جهت انجام واکنش Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). در نهایت سنجش بیان‌ژن‌ها با سه تکرار تکنیکی و روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه‌ای[1] $2^{-\Delta\Delta CT}$ صورت گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

این آزمایش بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تیمار پایه‌های 'پونسیروس'، 'سیترنج' و 'سیتروملو' و چهار تکرار انجام شد. هر تکرار شامل سه عدد میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' بود. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۰) صورت گرفت. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر پایه بر نسبت طول به قطر، وزن و چگالی پرتقال 'تامسون‌ناول' در سطح احتمال پنج درصد و صفات طول و قطر میوه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. تنها در صفت حجم میوه در پایه‌های مختلف مرکبات تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) در صفات ریخت‌شناسی میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' مشخص گردید که در پایه 'پونسیروس' طول میوه افزایش آماری معنی‌داری نسبت به دو پایه دیگر نشان داد (۸۱/۹۱ میلی‌متر). هم‌چنین قطر میوه در این پایه بیشتر از پایه‌های دیگر بود (۷۹/۲۶ میلی‌متر) و این افزایش نسبت به پایه 'سیتروملو' از نظر آماری معنی‌دار بود. نسبت طول میوه به قطر میوه در پایه 'پونسیروس'

1- Cycle of threshold

افزایش معنی‌داری نسبت به دو پایه دیگر نشان داد. از این رو میوه‌ها روی پایه 'پونسیروس'، ظاهری کشیده‌تر و روی پایه‌های 'سیتروملو' و 'سیترنج'، شکلی گردتر داشتند. بیشترین میزان وزن میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' متعلق به پایه 'پونسیروس' بود (۲۴۸ گرم). حجم میوه در پایه 'سیترنج' بالاتر بود اما با دو پایه دیگر در یک سطح آماری قرار داشت. به‌دلیل برداشت زودتر از موعد، چگالی میوه پائین‌تر از یک ثبت گردید به‌طوری‌که بالاترین میزان (۰/۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب) در پایه 'پونسیروس' مشاهده گردید اگرچه با پایه 'سیترنج' تفاوت معنی‌داری نداشت. این نتایج، با یافته‌های جاسکانی و همکاران (Jaskani *et al.*, 2006) که پایه‌های مرکبات در برخی شاخص‌های ریخت‌شناسی میوه در زمان برداشت تفاوت نشان داده است، همخوانی دارد. براساس مطالعات انجام شده توسط حیات و همکاران (Hayat *et al.*, 2022)، پاکوتاهی پایه را عاملی برای افزایش عملکرد محصول دانسته‌اند. اهمیت ابعاد میوه در سیستم حمل و نقل، سورتینگ و بسته‌بندی، شاخص وزن میوه بر قیمت فروش و میزان چگالی برای جابه‌جایی مرکبات و صنایع فرآوری در نظر گرفته می‌شود (Razavi & Akbari, 2009; Sattar *et al.*, 2014 Khojastehnazhand; *et al.*, 2010).

جدول ۲- ویژگی‌های آغازگرهای مورد مطالعه در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز میوه پرتقال 'تامسون‌ناول'

Table 2- Characteristics of the used primers in RT-qPCR reaction for 'Thomson Navel' orange

نام ژن Genes	آغازگر رفت Forward primer (5' to 3')	آغازگر برگشت Reverse primer (5' to 3')
CitSPS1	GTCCTACTCGTTACTTCGT	TTCCTCTCCTTCAATCTGTT
CitActin	CATTAGCACCAAGCAGCAT	GCCAGACTCATCATACTCAGA

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر پایه‌های مختلف بر صفات ریخت‌شناسی میوه پرتقال 'تامسون‌ناول'

Table 3- ANOVA for the effect of different rootstocks on the morphological traits of 'Thomson Navel' orange fruit

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات Mean squares					
		طول Length	قطر Diameter	نسبت طول به قطر Length/Diameter	حجم Volume	وزن Weight	چگالی Density
بلوک Block	3	4.295^{ns}	2.438^{ns}	0.001^{ns}	1.194^{ns}	60.083^{ns}	0.001^{ns}
پایه Rootstock	2	193.025**	45.713**	0.011*	72.750^{ns}	2605.083*	0.011*
خطا Error	6	2.259	1.604	0.001	19.194	206.750	0.001
ضریب تغییرات CV (%)		2.03	1.67	2.50	0.89	6.48	6.30

** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد

**and * significant at 1% and 5% of probility levels, respectively.

جدول ٤- اثر پایه‌های مختلف بر صفات ریخت‌شناسی در میوه پرتقال 'تامسون‌ناول'

Table 4- The effect of different rootstocks on the morphological traits in 'Thomson Navel' orange fruit

رقم Cultivar	طول Length (mm)	قطر Diameter (mm)	نسبت طول به قطر Length/Diameter	حجم Volume (cm^3)	وزن Weight (g)	چگالی Density ($g.cm^{-3}$)
پونسیروس Trifoliate orange	81.91 a	79.26 a	1.03 a	469 a	248 a	0.50 a
سیترنج Citrange	71.10 b	75.99 ab	0.95 b	490 a	220 ab	0.47 ab
سیتروملو Citrumelo	68.96 b	72.50 b	0.93 b	487 a	197 b	0.40 b

میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند.

Means with same letters show nonsignificant different at $p \leq 0.05$.

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۵) اثر پایه روی مواد جامد محلول در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. هم‌چنین اثر پایه روی صفات اسیدیته قابل تیتراسیون، شاخص طعم، ویتامین ث، اسیدیته، EC و قندکل تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد داشت.

نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۶) بیانگر آن است که بیشترین مواد جامد محلول (۱۰/۲۰ درصد بریکس) متعلق به پایه 'پونسیروس' بود در حالی‌که با پایه 'سیترنج' در یک سطح آماری قرار داشت. بیشترین درصد اسیدیته قابل تیتراسیون در پایه‌های 'سیترنج و 'سیتروملو' وجود داشت و کمترین میزان آن نیز در پایه 'پونسیروس' به‌دست آمد. شاخص طعم میوه در پایه 'پونسیروس' بالاتر از سایر پایه‌ها بود. بیشترین میزان ویتامین ث در پایه‌های 'سیترنج' و 'سیتروملو' وجود داشت. بیشترین و کمترین اسیدیته میوه به‌ترتیب مربوط به پایه 'پونسیروس' (۳/۳۵) و 'سیترنج' (۲/۷۴) بود. بالاترین میزان EC در پایه 'پونسیروس' (۳/۸۴ میلی زیمنس بر سانتی‌متر) به‌دست آمد. حداکثر میزان قند کل (۳۲/۷۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در پایه 'پونسیروس' بود در حالی‌که حداقل میزان (۲۵/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) آن در پایه 'سیتروملو' مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد تا زمانی‌که میوه روی درخت است، نوعی رقابت بر سر کربوهیدرات قابل دسترس وجود دارد که در نهایت منجر به تخلیه عناصر غذایی گیاه از برگ‌های منبع به سمت میوه 'تامسون‌ناول' می‌شود. بر همین اساس، قدرت رشدی درختان پاکوتاه 'پونسیروس' با حجم تاج کوچک می‌تواند سبب انتقال سریع‌تر مواد غذایی به میوه شود ولی در مقابل در درختان پابلند 'سیتروملو' با حجم تاج گسترده سرعت نقل و انتقال کندتر مواد غذایی منجر به انباشت کمتر قند می‌گردد. در بین پارامترهای بیوشیمیایی متعدد در سایر گونه‌های مرکبات تفاوت چشمگیری مشاهده شد (Gaikwad *et al.*, 2018). به گفته مازون و همکاران (Maazoun *et al.*, 2022) میزان اسیدیته و مواد جامد محلول میوه پرتقال روی پایه 'سیترنج C35' بیشترین میزان را داشت. در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که ارتباط پایه و پیوندک بر زمان بلوغ فیزیولوژیک در مرکبات تأثیر گذاشته، به‌گونه‌ای که بالاتر بودن اسیدیته نارنگی روی پایه نارنج سبب تأخیر در زمان بلوغ فیزیولوژیک میوه در مقایسه با سایر پایه شده است (Maazoun *et al.*, 2022; Macia-Vazquez *et al.*, 2024). علاوه‌بر این، میزان اسید آسکوربیک (ویتامین ث) در حین رسیدن میوه تابع عواملی مانند رقم، زمان برداشت و شرایط محیطی گزارش گردید (Magwaza *et al.*, 2017).

طبق نتایج تجزیه واریانس اثر پایه روی شاخص فنل‌کل پوست و گوشت میوه و فلاونوئیدکل پوست میوه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار و فقط بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست میوه در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود. هم‌چنین در صفات فلاونوئیدکل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گوشت میوه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۸) نشان داد که بیشترین میزان فنل‌کل پوست و گوشت میوه در پایه 'پونسیروس' در مقایسه با دو پایه دیگر وجود داشت. به‌طوری‌که میزان فنل‌کل در پوست میوه نسبت به گوشت میوه بالاتر بود. بیشترین میزان فلاونوئیدکل پوست و گوشت میوه در پایه 'پونسیروس' مشاهده شد. اما در گوشت میوه با دو پایه دیگر در یک سطح آماری قرار داشت و در پوست میوه با پایه 'سیترنج' تفاوت معنی‌داری نداشت. هم‌چنین میزان فلاونوئیدکل در اندام پوست میوه بیشتر از گوشت میوه ثبت گردید. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست میوه متعلق به پایه 'پونسیروس' بود (۷۷/۳۱ درصد). به‌طوری‌که فعالیت آنتی اکسیدانی پوست میوه در مقایسه با گوشت میوه بیشتر بود. از آنجایی‌که پوست میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' بیشتر در معرض پرتو فرابنفش و تغییرات شرایط محیطی قرار دارد بنابراین، متابولیت‌های ثانویه بیشتری در آن انباشت می‌گردد. در بررسی همتی و همکاران (Hemmati *et al.*, 2018) گفته شد که ارجحیت انباشت مواد فنلی در میوه مرکبات قبل از هر عاملی به خصوصیات ژنتیکی و نیز توانمندی ذاتی ارقام وابسته است (Nawaz *et al.*, 2020; Milosevic *et al.*, 2023). بررسی‌ها نشان داد که پوست میوه انار و سیب نیز ترکیبات فنلی بیشتری در مقایسه با گوشت میوه برخوردار است (Bakhshi *et al.*, 2011; Tehranifar *et al.*, 2014). زیرا پوست میوه محل انباشت غده‌های روغنی و زرد رنگ بوده و به موجب آن انباشت متابولیت‌های ثانویه در آن بخش گیاه متمایز عمل می‌کند (Hemmati *et al.*, 2015).

نتایج مقایسه میانگین در سطح مولکولی نشان داد که بیشترین سطح بیان نسبی ژن *CitSPS1* در پایه 'سیترنج' و کمترین آن در پایه 'سیتروملو' به‌دست آمد (شکل ۱). عدم تطابق بیشترین بیان نسبی پایه با نتایج انباشت قندکل به اهمیت نوع نسخه ژن مرتبط بود. هم‌چنین این تفاوت می‌تواند ناشی از اثر بیان سایر ژن‌ها مانند اینورتاز و ساکارزسنتاز در انباشت قندکل باشد. براساس مقایسه‌ای که بین سازوکار نسخه‌های مختلف ژن *CitSPS* در پایه‌های 'پونسیروس' و 'فلائینگ‌دراگون' انجام گرفته نشان می‌دهد که این تغییرات در میزان رونوشت ژن به ساختار ژنومی، رقم و مرحله نموی گیاه و نیز عوامل محیطی برمی‌گردد (HongDong *et al.*, 2019; *et al.*, 2022).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر پایه‌های مختلف بر ویژگی‌های کیفی در پرتقال ’تامسون‌ناول‘

Table 5- ANOVA for the effect of different rootstocks on the quality characteristics of ‘Thomson Navel’ orange fruit

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات Mean squares						
		مواد جامد محلول TSS	اسیدیته قابل تیتراسیون TA	شاخص طعم Flavor index	ویتامین ث Vitamin C	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC	قندکل Total sugar
بلوک Block	3	0.067^{ns}	0.001^{ns}	0.110^{ns}	1.041^{ns}	0.001^{ns}	0.007^{ns}	0.55^{ns}
پایه Rootstock	2	1.191^{*}	0.351^{**}	28.241^{**}	20.921^{**}	0.370^{**}	0.56^{**}	143.79^{**}
خطا Error	6	0.052	0.001	0.673	0.213	0.009	0.013	0.312
ضریب تغییرات CV (%)		2.34	6.97	8.89	1.59	3.18	3.27	1.99

** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد.

**and * significant at 1% and 5% of probility levels, respectively.

جدول ٦- مقایسه میانگین اثر پایه‌های مختلف بر ویژگی‌های کیفی در پرتقال ’تامسون‌ناول‘

Table 6- Comparison of the average effect of different rootstocks on the quality characteristics in ‘Thomson Navel’ orange

رقم Cultivar	مواد جامد محلول TSS (%)	اسیدیته قابل تیتراسیون TA (%)	شاخص طعم Flavor index	ویتامین ث Vitamin C ($mg.100g^{-1}$ FW)	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC ($mS.cm^{-1}$)	قندکل Total sugar ($mg.g^{-1}$ DW)
پونسیروس Trifoliate orange	10.20 a	0.90 b	11.35 a	25.9 b	3.35 a	3.84 a	32.71 a
سیترنج Citrange	9.83 a	1.43 a	6.97 b	30.1 a	2.74 c	3.10 c	26.40 b
سیتروملو Citrumelo	9.13 b	1.40 a	6.55 b	30.9 a	3.02 b	3.43 b	25.31c

میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند.

Means with same letters show nonsignificant different at $p \leq 0.01$.

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر پایه‌های مختلف بر صفات فیتوشیمیایی در پوست و گوشت میوه پرتقال ’تامسون‌ناول‘

Table 7- ANOVA for the effect of different rootstocks on the phytochemical traits in the peel and the pulp of the ‘Thomson Navel’ orange fruit

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean squares					
		فنل‌کل گوشت Pulp total phenol	فنل‌کل پوست Peel total phenol	فلاونوئیدکل گوشت Pulp total flavonoid	فلاونوئیدکل پوست Peel total flavonoid	فعالیت آنتی‌اکسیدانی گوشت Pulp antioxidant activity	فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست Peel antioxidant activity
بلوک Block	2	0.014^{ns}	0.004^{ns}	0.002^{ns}	0.006^{ns}	0.156^{ns}	0.199^{ns}
پایه Rootstock	2	0.035^{*}	0.388^{*}	0.002^{ns}	0.031^{*}	1.482^{ns}	15.140^{**}
خطا Error	6	0.003	0.017	0.002	0.001	1.111	0.554
ضریب تغییرات CV (%)		2.65	5.39	4.43	2.11	1.73	0.98

** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد.

**and * significant at 1% and 5% of probility levels, respectively.

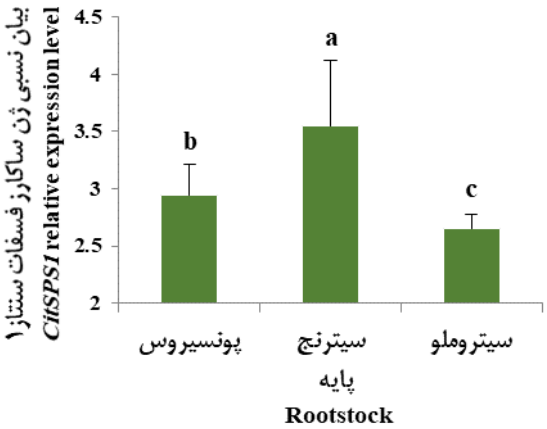
جدول ۸- اثر پایه‌های مختلف بر صفات فیتوشیمیایی در پوست و گوشت میوه پرتقال 'تامسون‌ناول'

Table 8- The effect of different rootstocks on the phytochemical traits in the peel and the pulp of the 'Thomson Navel' orange fruit

رقم Cultivar	فنل کل گوشت Pulp total phenol (mg.g^{-1} DM)	فنل کل پوست Peel total phenol (mg.g^{-1} DM)	فلاونوئیدکل گوشت Pulp total flavonoid (mg.g^{-1} DM)	فلاونوئیدکل پوست Peel total flavonoid (mg.g^{-1} DM)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی گوشت Pulp antioxidant activity (%)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی پوست Peel antioxidant activity (%)
پونسیروس Trifoliate orange	2.21 a	2.80 a	1.11 a	1.89 a	61.69 a	77.31 a
سیترنج Citrange	2.07 b	2.35 b	1.09 a	1.80 ab	60.84 a	75.84 b
سیتروملو Citrumelo	2.00 b	2.20 b	1.06 a	1.71 b	60.51 a	73.46 b

میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند.

Means with same letters show nonsignificant different at $p \leq 0.05$.



شکل ۱- اثر پایه‌های مختلف بر بیان نسبی ژن ساکارزفسفات‌سنتاز ۱ میوه پرتقال 'تامسون‌ناول'

Figure 1- The effect of different rootstocks on the relative expression *of sucrose phosphate synthase1* gene of 'Thomson Navel' orange fruit (Dancan, $p \leq 0.01$)

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان داد، بالاتر بودن میزان شاخص طعم و قندکل میوه پرتقال 'تامسون‌ناول' در پایه 'پونسیروس' سبب شد که رقم پیوندی روی این پایه نسبت به دو پایه دیگر کمی زودتر برداشت شود. در مقابل پایه 'سیتروملو' در مقایسه با دو پایه دیگر بلوغ دیررس میوه و بیان نسبی کمتر در ژن *CitSPS1* نشان داد. بر همین اساس، پایه پاکوتاه 'پونسیروس' گزینه مناسبی برای برداشت در زمان بلوغ تجاری پرتقال 'تامسون‌ناول' معرفی می‌گردد. هم‌چنین میزان ترکیبات فنلی این پایه سبب مقاومت بیشتر در برابر شرایط محیطی می‌گردد.

References

1- Akhlaghi Amiri, N., & Asadi Kangarshahi, A. (2022). Effect of C-35 Citrange rootstock on vegetative and reproductive characteristics of Miyagawa Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* 'Miyagawa') in the plain and foothills of East Mazandaran. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, *23*(1), 79-88. (In Persian)

2- Aguilar-Hernandez, M., Sanchez-Rodriguez, L., Hernandez, F., Forner-Giner, M.A., Postor-Perez, J., & Legua, P. (2020). Influence of new citrus rootstocks on lemon quality. *Agronomy*, 10(974), 10070974. https://doi.org/10.3390/agronomy10070974

3- Bakhshi, D., Fathollahi, S., & Arakawa, O. (2011). Evaluation of the relationship between phenolic compounds and skin color in three red apple cultivars in Japan. *Journal of Horticultural Science*, *24*(2), 251-258. (In Persian)

4- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, *26*, 1199-1200. https://doi.org/10.1038/1811199a0
5- Castle, W., Baldwin, J., & Muraro, R. (2010). Performance of 'Valencia' sweet orange rrees on 12 rootstocks at two locations and an economic interpretation as a basis for rootstock selection. *HortScience*, *45*(4), 523-533. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.4.523
6- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, *10*, 178-182. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748
7- Cherng, A.P., & Ouyang, F. (2003). A firmness index for fruit of ellipsoidal shape. *Biosystems Engineering*, *86*(1), 35-44. https://doi.org/10.1016/S1537-5110(03)00096-5
8- Citrus World Statistics. (2022). Word Citrus Organization. Summer 2021-Winter 2021-22.
9- Dong, T., Xiong, Bo., Huang, Sh., Liao, L., Qiu, X., Sun, G., He, Y., Duan, Ch., Wang, X., Zhang, X., Li, S., & Wang, Zh. (2019). Investigation of the cause of reduced sugar content in Kiyomi tangor fruit of ziyang xiangcheng (*Citrus junos sieb*. ex Tanaka) rootstock. *Scientific Reports*, *9*,19263. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55957-3
10- Fattahi Moghaddam, J., Seyed Ghasemi, A., & Madani, S. (2016). The effect of five rootstocks on the physical, mechanical and chemical characteristics of Yashar tangerine fruit during ripening stage. *Journal of Plant Production*, *24*(2), 109-123. (In Persian)
11- Fallahi, M. (1990). *Postharvest physiology of vegetables*. Book (vol.I). Dashte Morghab Productive Group, pub. Shahin.
12- Fotouhi Ghazvini, R., & Fattahi Moghadam, J. (2007). *Citrus growing in Iran*. The University of Guilan Press. Second Edition, pp, 143-184. (In Persian)
13- Gaikwad, K.A., Patil, S.R., Nagre, P.K., & Potdukhe, NR. (2018). Morphological characterization of citrus rootstock genotypes. *International Journal of Chemical Studies*, *6*(2), 516-529.
14- Hayat, F., Li, J., Iqbal, Sh., Peng, Y., Hong, L., Balal, R., Khan, M.N., Nawaz, M., Nawa, M.A., Khan, U., Farhan, M.A., Li, C., Song, W., Tu, P., & Cheng, J. (2022). A mini review of citrus rootstocks and their role in high-density orchards. *Plants*, *11*, 2876. https://doi.org/10.3390/plants11212876
15- Hemmati, N., Ghasemnezhad, A., Fattahi Moghaddam, J., & Ebrahimi, P. (2015). Investigating the relationship between the accumulation of fruit phenolic compounds in Salvestiana and Italian orange cultivars, with their rootstock fruits. *Journal of Crop Improvement*, *17*(3), 571-581. (In Persian)
16- Hemmati, N., Ghasemnezhad, A., Fattahi Moghaddam, J., & Ebrahimi, P. (2018). Variation in the content of bioflavonoids of orange as affected by scion, rootstock, and fruit part. *Acta Physiologiae Plantarum*, *40*, 83. https://doi.org/10.1007/s11738-018-2648-1
17- Hong, H.R., Oh, E.U., Han, S.G., Yun, S.H., Kim, H.B., & Song, K.J. (2022). Characterization of soluble sugar content, related enzyme activity and gene expression in the fruits of 'Minihyang' mandarin on different rootstocks. *Horticulturae*, *8*, 47. https://doi.org/10.3390/horticulturae8010047
18- Iglesias, D.J., Cercos, M., Colmenero-Flores, J., Naranjo, M., Rios, G., Carrera, E., Ruiz-River, O., Liso, I., Morillon, R., Tadeo, F., & Talon, M. (2007). Physiology of citrus fruiting. *Plant Physiology*, *9*(4), 333-362. https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400006
19- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, *84*, 55-60. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x
20- Jaskani, M., Abbas, H., Khan, M., Shahzad, U., & Hussain, Z. (2006). Morphological despcription of three potential citrus rootstocks. *Pakistan Journal of Botany*, *38*(2), 311-317.
21- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., & Yano, M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, *134*, 824–837. https://doi.org/10.1104/pp.103.031104
22- Khojastehnazhand, M., Omid, M., & Tebatabaeefar, A. (2010). Development of a lemon sorting system basedon color and size. *African Journal of Plant Science*, *4*(4), 122-127.
23- Kim, D.O., Padilla-Zakour, O.I., & Griffiths, P.D. (2004). Flavonoids and antioxidant capacity of various cabbage genotypes at juvenile stage. *Journal of Food Science*, *69*, 685-689. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09916.x
24- Komatsu, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M., & Akihama, T. (2002). Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogentic relationship. *Journal of Experimental Botany*, *53*(366), 61-71. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.61
25- Maazoun, A.M., Zerai, O., Aounallh, M.K., Bey, N., Hemmami, S., & Bettaieb, T. (2022). Rootstocks effects on yield, fruit characteristics, and juice quality of the Tunisian Malttese half-blood (*Citrus sinensis* L.Osbeck): an

important citrus cultivar. *International Journal of Horticulture, Agriculture and Food Science*, *6*(3). https://doi.org/10.22161/ijhaf.6.3.4

26- Macia-Vazquez, A., Martinez-Nicolas, J., Nunez-Gomez, D., Melgarejo, P., & Legua, P. (2024). Influnce of rootstock on yield, morphological, biochemical and sensory characteristics of Afourer variety mandarins. *Scentia Horticulturae*, *325*, 112644. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112644

27- Magwaza, L.S., Mditshwa, A., Tesfay, S.Z., & Opra, U.L. (2017). An overview of preharvest factors affecting vitamin C content of citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, *216*, 12-21. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.021

28- Mashayekhi, K., & Atashi, S. (2017). *The analyzing methods in plant physiology*. Agricultural Education Research Publications. pp. 163-164. (In Persian)

29- Mashayekhi, K., Sadeghi, H., Akbarpour, V., Atashi, S., Mosavizadeh, J., Abshai, M., & Nazari, Z. (2014). The effect of several different citrus rootstocks on the amount of biochemical compounds of Parson Brown and Mars oranges in Jiroft. *Journal of Horticultural Science*, *27*(1), 10-17. (In Persian)

30- Mccready, R., Guggolz, M. J., Silviera, V., & Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables analytical. *Analytical Chemistry*, *22*, 1156-1158.

31- Mesejo, C., Marzal, A., Martinez-Fuentes, A., Reig, C., & Agusti, M., (2021). On how auxin, ethylene and IDA-peptide relate during mature *Citrus* fruit abscission. *Scientia Horticulturae*, *278*, 109855. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109855

32- Milosevic, T., Milosevic, N., & Mladenovic, J. (2023). Diversity of plums belonging to *P.domestica* L., *P.insititia* L. and *prunus × rossica* Erem. Tree vigour, yielding and fruit quality attributes. *Scientia Horticulturae*, *320*, 112220. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112220

33- Nawaz, R., Abbasi, N.A., Ahmad Hafiz, I., & Khalid, A. (2020). Impact of climate variables on fruit internal quality of Kinnow mandarin in ripening phase grown under varing environmental conditions. *Scientia Horticulturae*, *265*, 109235. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109235

34- Oustric, J., Morillon, R., Luro, F., Herbette, S., Lourkisti, R., Giannettini, J., Berti, L., & Santini, J. (2017). Tetraploid Carrizo Citrange rootstock (*Citrus sinensis* Osb.×*Poncirus trifoliate* L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (*Citrus clementine* Hort. ex Tan). *Journal of Plant Physiology*, *214*, 108-115. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.014

35- Peng, G., Xie, X., Jiang, Q., Song, S., & Xu, Ch. (2013). Chlorophyll *a*/*b* binding protein plays a key role in natural and ethylene-induced degreening of Ponkan (*Citrus reticulate* Blanco). *Scientia Horticulturae*, *160*, 37-43. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.022

36- Razavi, M.A., & Akbari, R. (2009). *Biophysical properties of agricultural products and foodstuffs*. Jahad Daneshgahi of Mashad University. Press, p. 304.

37- Sarkar, N., Srivastava, P.K., & Dubey, V.K. (2009). Understanding the language of vitamin C. *Current Nutrition & Food Science*, *5*, 53–5. https://doi.org/10.2174/157340109787314767

38- Sattar, N., Ziauddin, Sh., Kalsoom, S., Shahid, A., Ullah, R., & Dar, A. (2014). An orange sorting technique based on size and external defects. *ResearchGate*, 274314889.

39- Skinner, J. (1997). Measuring the amount of vitamin C in fruit drinks. Experiments. Royal Society of Chemistry. p.67.

40- Swingle, W.T., & Reece, P.C. (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. The citrus industry, vol 1. University of California, Berkeley, pp. 190–430.

41- Tehranifar, A., Zarei, M., Esfandiyari, B., & Nemati, Z. (2014). Study of physical properties, phenolics compounds and antioxidant activity of thirty different Iranian cultivars of pomegranates peels. *Journal of Horticultural Science*, *28*(3), 312-318. (In Persian)

42- Yamaki, S. (2010). Metabolism and accumulation of sugars translocated to fruit and their regulation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *79*(1), 1-15.

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 611-625

Postharvest L-phenylalanine Application on Shelf life and Physicochemical Characteristics of Sabrina Strawberry During Cold Storage

K. Manda-Hakki[1*], H. Hassanpour[2]

1 and 2- M.Sc Degree in Horticultural Science and Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Karim.manda1995@gmail.com)

Received: 30-03-2024
Revised: 08-06-2024
Accepted: 16-06-2024
Available Online: 16-06-2024

How to cite this article:
Manda-Hakki, K., & Hassanpour, H. (2024). Postharvest L-phenylalanine application on shelf life and physicochemical characteristics of Sabrina strawberry during cold storage. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 611-625. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.87437.1334

Introduction

One of the most important global challenges is food waste, about 30% of the world's agricultural land is wasted. Every year, about 9.5 million tons of food is lost in the post-harvest phase of agriculture. Therefore, storage technology is very important to increase shelf life, preserve nutrition and maintain the taste of fresh products. Storing strawberry fruits at an inappropriate temperature after harvesting significantly increases weight loss, rotting and softening. L-phenylalanine as an amino acid is used for the biosynthesis of all phenolic compounds through the phenylpropanoid pathway. In recent years, the application of exogenous phenylalanine has been considered for use as a biologically safe molecule to maintain the postharvest quality of many horticultural crops. L-phenylalanine treatment has been reported to reduce the frost damage of plum fruit during cold storage by maintaining membrane integrity and improving reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity. The treated fruit showed a higher DPPH inhibition capacity by increasing the accumulation of phenolic compounds and antioxidant enzyme activity. Aghdam *et al.* (2019) also reported that application of L-phenylalanine significantly reduced cold damage, membrane lipid peroxidation and ROS accumulation in tomato fruits during cold storage.

Materials and Methods

Strawberry fruits were obtained from a commercial greenhouse located in Urmia at full maturity stage. The fruits were transported to the laboratory of the Department of Horticultural Sciences in Urmia University with necessary precautions to prevent any mechanical damage to the product. The fruits were separated in terms of size and uniformity, so that the fruits were divided into 3 groups, one group as a control group and 2 groups were treated with concentrations of L-phenylalanine (4 and 8 mM). After drying the treated fruits, they were placed in zipped nylon bags and kept in a cold room for 15 days at a temperature of 3 ± 0.5 °C and a relative humidity of 90-95%. Also, three biological replicates at each time point were included in the analysis. The samples obtained at each of these times were used to evaluate skin color, titratable acidity, soluble solids, taste index, pH, weight loss, firmness, antioxidant capacity, total phenol content, and polyphenol oxidase enzyme activity.

Results and Discussion

The results showed that the effect of post-harvest treatment, storage time, and the interaction between them were statistically significant on all of the traits. In terms of color changes, the effect of post-harvest treatment ($p \leq 0.05$) was significant only in b* index, and the highest rate was observed in the 4 Phe treatment. The effect of storage time was also significant in a* and Chroma indices ($p \leq 0.05$) and the highest level was observed in both of these indices at day 5. The effect of storage time was also significant in TA ($p \leq 0.01$), the highest value was observed in day 10. In antioxidant capacity ($p \leq 0.05$), TSS ($p \leq 0.05$) and taste index ($p \leq 0.01$), the interaction effect between storage time and Phe treatment was significant. In antioxidant capacity, the highest percentage of DPPH inhibition was observed

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.87437.1334

in day 10 and 4 Phe treatment, in TSS, the highest rate was observed on day 10 and 8 Phe treatment, and in taste index, the highest rate was observed on day 15 and 4 Phe treatment. The effect of post-harvest Phe treatment and storage period on fruit weight loss was significant ($p \leq 0.05$) and ($p \leq 0.01$) respectively, and the lowest percentage of weight loss was observed in Phe 4 and day 5. In terms of firmness and total phenol content, only the effect of Phe treatment was significant ($p \leq 0.05$) and ($p \leq 0.01$), respectively, the highest level of firmness in the 4 Phe treatment and the highest amount of total phenol content in the 8 Phe treatment were observed. In the PPO enzyme, only the effect of storage time ($p \leq 0.05$) was significant.

Conclusion

According to the obtained results, the 4 Phe treatment is the best concentration of phenylalanine to increase the shelf life of harvested strawberry fruits under cold storage.

Keywords: Amino acid, Fruit firmness, Titratable acid, Total phenol

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، ص. ۶۱۱-۶۲۵

کاربرد پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر ماندگاری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی نگهداری در سردخانه

کریم مندا حکی[1*] - حمید حسن‌پور[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

چکیده

توت‌فرنگی یکی از میوه‌هایی است که به‌دلیل رنگ، شکل، عطر و طعم آن معروف و به‌دلیل محتوای بالای ترکیبات فعال زیستی مانند ویتامین C، ویتامین E، بتا کاروتن و آنتوسیانین‌ها، یکی از مهم‌ترین میوه‌ها از نظر اقتصادی در سراسر جهان می‌باشد اما این میوه در برابر بیماری‌ها و پوسیدگی بسیار آسیب‌پذیر است. یکی از چالش‌های مهم جهانی ضایعات مواد غذایی است. از ترکیبات شیمیایی نظیر اسیدهای آمینه می‌توان جهت افزایش ماندگاری پس از برداشت به‌عنوان یک تیمار مناسب استفاده کرد. در این پژوهش اثر تیمار پس از برداشت ال_فنیل‌آلانین در غلظت‌های (صفر، ۴ و ۸ میلی‌مولار) و زمان انبارمانی (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' طی مدت انبارمانی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله، بیشترین مقدار شاخص رنگ b^* در تیمار ۴ میلی مولار، مواد جامد محلول (تیمار ۸ میلی‌مولار)، شاخص طعم (تیمار ۴ میلی‌مولار)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (تیمار ۴ میلی‌مولار) و محتوی فنل کل (تیمار ۸ میلی‌مولار) بود. همچنین کمترین درصد کاهش وزن و کاهش سفتی در تیمار ۴ میلی‌مولار مشاهده شد. بطور کلی نتایج بدست آمده نشان داد که می‌توان از تیمار ۴ میلی‌مولار ال-فنیل‌آلانین به‌عنوان مناسب‌ترین غلظت برای افزایش ماندگاری پس از برداشت توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسیدآمینه، اسیدیته قابل تیتراسیون، سفتی بافت میوه، فنل کل

مقدمه

توت‌فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Duch) یک میوه مهم اقتصادی است که در سراسر جهان مصرف می‌شود و به‌دلیل رنگ، شکل، عطر، طعم و بافت لذیذ منحصر به فرد خود معروف می‌باشد (Khalifa *et al.*, 2016). همچنین توت‌فرنگی به‌دلیل محتوای بالای ترکیبات فعال زیستی مانند ویتامین C، ویتامین E، بتا کاروتن و آنتوسیانین‌ها، یکی از مهم ترین میوه‌ها از نظر اقتصادی در سراسر جهان می‌باشد. با این حال، این میوه‌ها دارای سرعت تنفس بالایی هستند که باعث می‌شود ماندگاری پس از برداشت آن کاهش یابد. آسیب مکانیکی و عفونت ناشی از میکروب‌ها نیز عوامل مهمی هستند که در تغییر رنگ، استحکام، کیفیت و تلفات پس از برداشت دخالت دارند (Piechowiak *et al.*, 2019; Chu *et al.*, 2020).

به‌طور خاص، توت‌های برداشت شده سطوح اسید آبسیزیک را در مقایسه با شرایط عادی افزایش می‌دهند که منجر به افزایش سرعت فرآیند رسیدن و در نتیجه پیری میوه می‌شود (Chen *et al.*, 2014). یکی از چالش‌های مهم جهانی ضایعات مواد غذایی است که حدود ۳۰ درصد از مساحت زمین کشاورزی جهان در حال هدر رفتن است. هر سال حدود ۹/۵ میلیون تن غذا در مرحله پس از برداشت کشاورزی از بین می‌رود (Bishop *et al.*, 2021). بنابراین، فناوری انبارداری برای افزایش ماندگاری، حفظ تغذیه و حفظ طعم کالاهای تازه اهمیت زیادی دارد (Brizzolara *et al.*, 2020; Holler *et al.*, 2023).

نگهداری میوه‌های توت‌فرنگی در دمای نامناسب پس از برداشت به‌طور قابل توجهی کاهش وزن، ایجاد پوسیدگی و نرم شدن آن را افزایش می‌دهد (Gol *et al.*, 2013). با این حال، قرار گرفتن در معرض دمای پایین نیز ممکن است باعث ایجاد آسیب سرمایی شود

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Karim.manda1995@gmail.com)
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.87437.1334

که بر کیفیت میوه تأثیر منفی می‌گذارد (Bustamante *et al.*, 2016).

یکی از ترکیبات شیمیایی استفاده شده برای افزایش نگهداری پس از برداشت میوه‌ها، اسیدهای آمینه می‌باشند. اسید آمینـه، ترکیب آلی دارای نیتروژن است و محصولات با پایـه اسید آمینه در دهه گذشته به‌وسیله کشاورزان استفاده شده است و باعث بهبود عملکرد و رشد گیاهان مختلف شده است. مزایای استفاده از اسید آمینه بـا محتوای نیتروژن آلی در ارتباط با تعامل مثبت و سازنده با در دسترس بودن برخی مـواد معـدنی و مغـذی اسـت (Cerdna *et al.*, 2009). همچنین اسیدهای آمینه به‌عنوان مولکول‌های واسطه هورمون‌های گیاهی درون‌زا، به سنتز پروتئین کمک می‌کنند و تأثیر کمپلکس‌کننده‌ای بر مواد مغذی دارند (Taiz *et al.*, 2017).

واحدهای تشکیل دهنده پروتئین اسیدهای آمینه می‌باشند که در ایجاد مقاومت به بیماری‌ها و آفات، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی نقش مهمی دارند. فنیل‌استیک‌اسید نخستین ترکیب حدواسط برای سنتز ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین، لیگنین و تانن می‌باشد که اسیدآمینه فنیل‌آلانین ماده اصلی تشکیل دهنده‌ی این مولکول مهم زیستی است (Garde-Cerdan *et al.*, 2014). فنیل‌آلانین با نام شیمیایی acid 2-Amino-3-phenylpropanoic یکی از ۲۰ اسید آمینه اصلی می‌باشد که یک آلفا آمینو اسید با فرمول شیمیایی $C_9H_{11}NO_2$ است (Portu *et al.*, 2015).

فنیل‌آلانین به‌عنوان یک اسید آمینه برای بیوسنتز تمام ترکیبات فنلی از طریق مسیر فنیل پروپانوئید استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، کاربرد فنیل‌آلانین برون‌زا برای استفاده به‌عنوان یک مولکول ایمن بیولوژیکی برای حفظ کیفیت پس از برداشت بسیاری از محصولات باغبانی مورد توجه قرار گرفته است (Kumar Patel *et al.*, 2020).

در آزمایشی که در آن اثر تیمارهای پس از برداشت فنیل‌آلانین و سولفید هیدروژن بر حفظ کیفیت و افزایش عمر انبارمانی میوه بادنجان (*Solanum melongena* L.) بررسی گردید، مشخص شد که تیمارهای ۷/۵ میلی‌مولار فنیل‌آلانین و ۳ میلی‌مولار سولفید هیدروژن جهت حفظ کیفیت میوه، تأخیر کاهش وزن و آسیب سرمازدگی و افزایش عمر انبارمانی میوه مناسب می‌باشند (Najafi *et al.*, 2021).

همچنین گزارش شده است که تیمار فنیل‌آلانین با حفظ یکپارچگی غشاء و بهبود ظرفیت مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)آسیب سرمازدگی میوه آلو را در طول ذخیره‌سازی سرد کاهش می‌دهد میوه تیمار شده با افزایش انباشت ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی، ظرفیت مهار DPPH بالاتری را نشان داد (Sogvar *et al.*, 2020). همچنین اقدم و همکاران (Aghdam *et al.*, 2019) نیز گزارش کردند که کاربرد فنیل‌آلانین به‌طور قابل توجهی آسیب ناشی از سرما، پراکسیداسیون لیپید غشایی و تجمع ROSرا در میوه‌های گوجه‌فرنگی در طی نگهداری سرد کاهش داد.

با توجه به اهمیت تغذیه‌ای توت‌فرنگی و عمر انبارداری کم آن نیاز به استفاده از روش‌هایی جهت افزایش عمر پس از برداشت و حفظ ویژگی‌های بیوشیمیایی آن ضروری می‌باشد، علی‌رغم اینکه فنیل‌آلانین اثرات مثبتی بر عمر پس از برداشت و ویژگی‌های بیوشیمیایی میوه‌ها و سبزیجات دارد، اما با توجه به اطلاعات ما، تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از این ترکیب و اثرات آن بر فیزیولوژی پس از برداشت توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' ارائه نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش ارزیابی تأثیر پس از برداشت فنیل‌آلانین بر ماندگاری و حفظ ویژگی‌های بیوشیمیایی و کیفی توت‌فرنگی می باشد.

مواد و روش‌ها

میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' مورد آزمایش در این پژوهش از یک گلخانه تجاری واقع در ارومیه در مرحله بلوغ و رسیدگی کامل تهیه شد. میوه‌ها با احتیاط لازم جهت جلوگیری از وقوع هر گونه آسیب مکانیکی به محصول، به آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. میوه‌ها از نظر اندازه و یکنواختی تفکیک گردیده، بطوری که میوه‌ها به ۳ گروه ۱۵ عددی تقسیم شده یک گروه به‌عنوان گروه شاهد و ۲ گروه به‌ترتیب با غلظت‌های ال-فنیل‌آلانین (۴ و ۸ میلی-مولار) به‌صورت محلول‌پاشی بر روی میوه‌ها تیمار شدند. بعد از خشک شدن میوه‌های تیمار شده، آن ها در داخل کیسه‌های نایلونی زیپ‌دار قرار داده شده و به‌مدت ۱۵ روز در دمای ۰/۵ ± ۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۵–۹۰ درصد در سردخانه نگهداری شدند. همچنین سه تکرار بیولوژیکی در هر سه نقطه زمانی در آنالیز گنجانده شد. نمونه‌های بدست آمده در هر یک از این زمان‌ها جهت ارزیابی رنگ پوست، اسیدیته قابل تیتراسیون، مواد جامد محلول، شاخص طعم، pH، کاهش وزن، سفتی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنل کل و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مورد استفاده قرار گرفتند.

تغییرات رنگ پوست با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (CHROMA METER CR-400) ساخت ژاپن در دو نقطه‌ی پوست میوه اندازه‌گیری شد. در این روش مقادیر L*، a*، b*، Hue angle = arctan (b*/a*) و Chroma=(a*2+b*2)*1/2 اندازه‌گیری شدند (Pathare *et al.*, 2013).

برای اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتراسیون از روش ارکان و سلوک (Erkan & Selcuk., 2015) با کمی تغییر استفاده شد. همزمان با قرائت pH، عمل تیتراسیون توسط هیدروکسید سدیم (NaOH) ۰/۱ نرمال تا زمانی که pH عصاره به عدد ۸/۲ برسد انجام شد. بر اساس مقدار هیدروکسید سدیم مصرفی در جریان تیتراسیون مقدار اسید موجود در عصاره میوه به‌صورت میلی‌گرم اسید سیتریک در ۱۰۰ گرم محاسبه شد:

$$TA=(S\times N\times F\times E/C)\times 100$$

در این رابطه:TA مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون، S: مقدار NaOH مصرفی، N: نرمالیته، F: فاکتور NaOH، C: مقدار عصاره میوه، E: اکی‌والان اسید سیتریک

برای اندازه‌گیری مواد جامد محلول از رفراکتومتر دستی مدل (ATAGO) استفاده شد (Jalili Marandi., 2013). همچنین شاخص طعم هر نمونه نیز از طریق مقدار مواد جامد محلول (TSS) بر اسیدیته قابل تیتراسیون (TA) بدست آمد (Pelayo-zaldivar., 2005). میزان pH آبمیوه نیز با دستگاه pH متر دیجیتالی مدل (pH-Mtere CG 824) اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری درصد کاهش وزن میوه‌ها، قبل از قرار دادن میوه‌ها در انبار و در روز پنجم، دهم و پانزدهم وزن آنها با استفاده از ترازوی دیجیتالی (CANDGL مدل ۳۰۰) اندازه‌گیری و درصد کاهش وزن با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Meng *et al.*, 2007).

$$\text{درصد کاهش وزن} = \frac{\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

سفتی بافت میوه با استفاده از دستگاه تجزیه و سنجش بافت مدل (Texture analyser) ساخت انگلستان با پروب به قطر ۲ میلی‌متر بر روی میوه‌ها انجام گرفت و نتایج بر حسب کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع بیان شد (Jalili Marandi., 2013).

جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از رادیکال آزاد DPPH (2,2-Diphenyl- picryl- Hydtazyl) استفاده شد. برای اندازه‌گیری توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد، ۵۰ میکرولیتر از عصاره آماده شده را با ۱۹۵۰ میکرولیتر DPPH مخلوط کرده و سپس نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند و جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Dynamica HALO DB_20) با طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شده و بر اساس فرمول زیر با درصد بازدارندگی محاسبه گردید (Nakajima *et al.*, 2004).

$$\text{درصد مهار رادیکال} = (\text{Ablank_Asample} / \text{Ablank}) \times 100$$

که در این فرمول A blank ; جذب نمونه شاهد وA sample; جذب نمونه‌ها می‌باشد.

برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل به ۳۰ میکرولیتر از عصاره، ۶۰۰ میکرولیتر معرف فولین‌سیوکالتو ۱۰ درصد و ۹۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت ۶ دقیقه ۴۸۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه گردید و حجم نهایی به ۱۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد (Du *et al.*, 2009). سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱/۵ لی ۲ ساعت در محل تاریکی در دمای اتاق نگهداری شدند. بعد از این مدت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل(Dynamica HALO DB_20) قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در ۱۰۰ گرم وزن تر میوه بیان شد.

تهیه عصاره آنزیمی: هموژن حاصل از خیساندن و خرد کردن ۵۰۰ میکرولیتر از آبمیوه تهیه شده در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH=7.5 متشکل از ۱ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (pvp)و ۱ میلی‌مولار EDTA به‌عنوان یک عصاره آنزیمی برای ارزیابی آنزیم استفاده شد. محتوای پروتئین پس از سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (Bradford., 1976).

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) از روش پیزوکارو و همکاران (Pizzocaro, 1993) بر اساس اکسیداسیون کاتکول استفاده شد. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر ماده بافری را به ۰/۵ میلی لیتر عصاره آنزیمی اضافه کرده و پس از قرار دادن به‌مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۰۰ نانومتر به‌مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت از میزان تغییر PPO به مقدار ۰/۰۰۱ در دقیقه در یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیم بود.

$$\text{فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (واحد در دقیقه در ۱۰۰ گرم وزن تر)} = (\Delta A\times 1000)/(0/001\times 25)$$

ΔA =اختلاف جذب

25 =میزان گرم آنزیم به کار رفته

پژوهش حاضر بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با تعداد ۱۵ میوه در هر تکرار در هر مرحله نمونه‌برداری انجام شد. فاکتور اول غلظت‌های مختلف فنیل‌آلانین در سه سطح صفر، ۴ و ۸ میلی‌مولار و فاکتور دوم زمان انبارمانی در سه سطح ۵، ۱۰ و ۱۵ روز بود. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به تجزیه واریانس صفات نشان داد که تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین اثر معنی‌داری بر b^* رنگ (۵ درصد)، کاهش وزن (۵ درصد)، سفتی بافت میوه (۵ درصد) و محتوی فنل کل (یک درصد) داشت. همچنین اثر معنی‌داری زمان انبارمانی نیز بر صفات a^* (۵ درصد)، Chroma (۵ درصد)، اسیدیته قابل تیتراسیون (یک درصد)، کاهش وزن (یک درصد) و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (۵ درصد) بود. در برخی از صفات نیز اثر متقابل بین تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین و مدت زمان انبارمانی مشاهده شد، این اثر معنی‌دار بر مواد جامد محلول (۵ درصد)، شاخص طعم (یک درصد) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۵ درصد) بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کاربرد پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طول نگهداری در انبار سرد

Table 1- ANOVA for the effect of post-harvest application of L-phenylalanine on the physicochemical characteristics of strawberries cv. Sabrina during cold storage

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares						
		a^*	b^*	L^*	Chroma	Hue	کاهش وزن Weight loss	pH
فنیل‌آلانین Phenylalanine (P)	2	1.86^{ns}	14.01^{*}	8.61^{ns}	9.62^{ns}	31.1^{ns}	0.18^{*}	0.25^{ns}
زمان انبارمانی Storage time (ST)	2	18.1^{*}	5.97^{ns}	5.61^{ns}	29.01^{*}	1.49^{ns}	2^{**}	0.29^{ns}
P × ST		4.40^{ns}	1.88^{ns}	5.23^{ns}	8.88^{ns}	1.07^{ns}	0.030^{ns}	0.073^{ns}
خطا Error	4	4.93	4.02	7.40	7.99	15.04	0.062	0.036
ضریب تغییرات C.V (%)	18	7.84	16.45	9.39	9.27	16.69	16.14	4.69

^{ns}، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

^{ns}, ** and *:non-significant, and significant at the 1% and 5% of probability levels, respectively

ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کاربرد پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طول نگهداری در انبار سرد

Table 1 continued- ANOVA for the effect of post-harvest application of L-phenylalanine on the physicochemical characteristics of strawberries cv. Sabrina during cold storage

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares						
		اسیدیته قابل تیتراسیون TA	مواد جامد محلول TSS	طعم TSS/TA	سفتی بافت میوه Fruit firmness	ظرفیت آنتی اکسیدانی Antioxidant capacity	محتوی فنل کل Total phenol content	آنزیم پلی‌فنل اکسیداز PPO activity
فنیل‌آلانین Phenylalanine (P)	2	0.04^{ns}	3.89^{*}	0.10^{ns}	0.017^{*}	661.4^{**}	70379.2^{**}	13792^{ns}
زمان انبارمانی Storage time (ST)	2	0.19^{**}	2.89^{*}	3.83^{*}	0.0009^{ns}	61.35^{ns}	9730^{ns}	113348^{*}
P × ST		0.035^{ns}	2.64^{*}	4.55^{**}	0.004^{ns}	126.9^{*}	9061^{ns}	370^{ns}
خطا Error	4	0.021	0.85	0.81	0.005	50.84	5535.5	25733
ضریب تغییرات C.V (%)	18	12.78	10.36	11.52	11.07	11.11	10.1	71.9

^{ns}، **و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

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

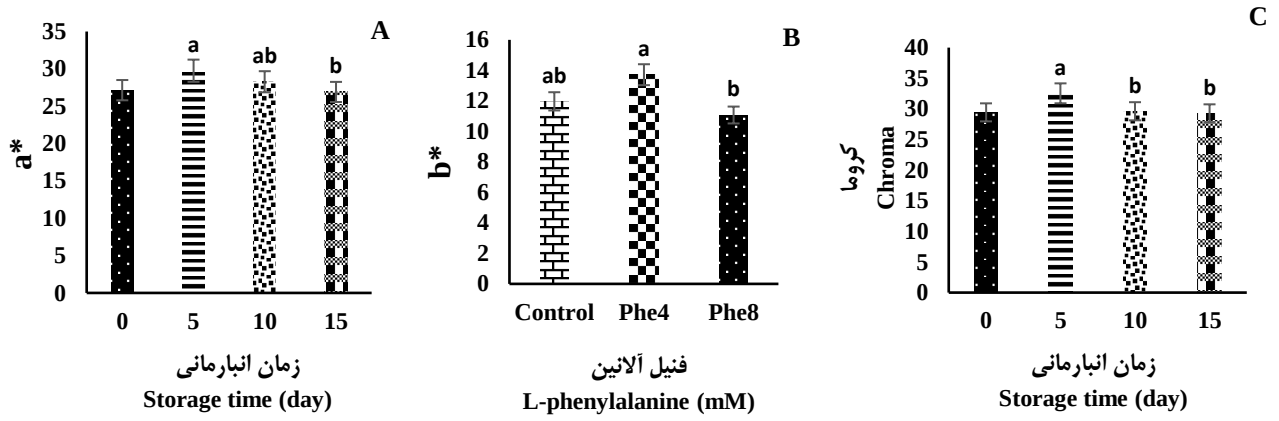
تغییرات رنگ: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، برخی از شاخص‌های رنگی دچار تغییر شده‌اند. اثر تیمار پس از برداشت فنیل آلانین فقط بر شاخص b* در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱) که بالاترین میزان آن در تیمار ۴ میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (شکل ۱). البته اثر فنیل‌آلانین در شاخص‌های a*، L*، Chroma و Hue معنی‌دار نبود که این نشان‌دهنده اثر مثبت فنیل آلانین بر حفظ این شاخص‌ها می‌باشد (جدول ۱). اثر زمان انبارمانی در شاخص‌های a* و Chroma در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین مقادیر هر دوی این شاخص‌ها در روز ۵ انبارمانی مشاهده گردید و در زمان‌های دیگر کاهش یافت (شکل ۱). یکی از شاخص‌های کیفی و مهم بازارپسندی، رنگ میوه است. با گذشت زمان و همزمان با شدت گرفتن تخریب رنگدانه‌ها تحت واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی میزان این شاخص‌های رنگی کاهش می‌یابد. همچنین در میوه‌ها و سبزی‌ها با گذشت زمان انبارمانی در اثر افزایش pH و شدت تنفس، رنگدانه‌های آن‌ها تجزیه شده و در نتیجه کیفیت ظاهری و رنگی آن کاهش می‌یابد (Daraei Garmakhany *et al.*, 2021).

اسیدیته قابل تیتراسیون: بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر مدت زمان انبارمانی بر میزان اسیدیته قابل تیتراسیون میوه توت فرنگی رقم 'سابرینا' در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱) و بیشترین مقدار آن در روز ۱۰ انبارمانی مشاهده گردید (شکل ۲). همچنین اثر تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین و اثر متقابل بین مدت زمان انبارمانی و تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین بر اسیدیته قابل تیتراسیون میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' معنی‌دار نبود. یکی از ویژگی های مهم در تعیین کیفیت میوه، اسیدیته قابل تیتراسیون می‌باشد و اسید قابل تیتراسیون با غلظت اسیدهای ارگانیک موجود در میوه رابطه مستقیمی دارد (Akhtar *et al.*, 2010). میزان اسیدهای آلی پس از برداشت میوه‌ها به مواد جامد محلول و سرعت تجزیه این اسیدها بستگی دارد. تجزیه اسیدهای آلی نیز به سرعت تنفس بستگی دارد. از آنجا که ماده اولیه واکنش‌های آنزیمی تنفس، اسیدهای آلی می‌باشند، انتظار می‌رود طی مدت زمان انبارمانی اسیدیته میوه کاهش و مقدار pH آن افزایش یابد (Taherpour *et al.*, 2020). همچنین فنل‌ها به کاهش تنفس و تولید اتیلن کمک کرده و در مجموع سرعت فرآیند متابولیکی و مصرف اسیدهای آلی را کاهش می‌دهد (Asghari *et al.*, 2019). کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون در زمان انبارمانی به دلیل تغییرات متابولیکی میوه ناشی از مصرف شدت اسیدهای آلی در فرآیند تنفس می‌باشد (Akhond *et al.*, 2022).

مواد جامد محلول: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، اثر متقابل بین مدت زمان انبارمانی و تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین در سطح احتمال ۵ درصد اثر معنی‌داری بر میزان مواد جامد محلول میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی مدت زمان انبارمانی داشت (جدول ۱). بیشترین مقدار TSS در روز ۱۰ و در تیمار ۸ میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (شکل ۳). یکی از شاخص‌های کیفی مهم که رابطه بالایی با ساختار میوه دارد مواد جامد محلول می‌باشد. میوه حاوی قندهایی مانند نشاسته، گلوکز، فروکتوز، ساکارز می‌باشد که مقادیر بالای آن‌ها در دوره رسیدن میوه و پس از برداشت به‌دلیل هیدرولیز نشاسته افزایش می‌یابد (Davarpanah *et al.*, 2013). با گذشت زمان و از دست دادن رطوبت میوه، غلظت مواد جامد محلول افزایش می‌یابد. از سوی دیگر طی فرآیند تنفس، ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی تجزیه و به قندهای محلول تبدیل شده و در نهایت مواد جامد محلول به شدت افزایش می‌یابد. در نتیجه عواملی که سبب کاهش و یا ممانعت از تجزیه دیواره سلولی می‌گردند از افزایش بیش از حد مواد جامد محلول جلوگیری می‌نمایند (Shahimoridi & Dastjerdi, 2020). در طی محلول‌پاشی بر روی توت‌فرنگی با ۱۰۰ میکرومولار فنیل‌آلانین باعث افزایش مواد جامد محلول گردید (Mohseni *et al.*, 2015).

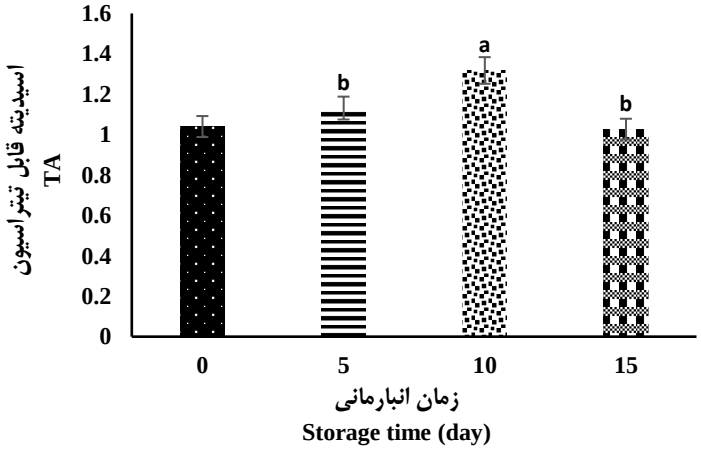
شاخص طعم: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثر متقابل بین مدت زمان انبارمانی و تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین بر شاخص طعم میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در سطح احتمال ۵ درصد اثر معنی‌داری داشت. میوه‌های تیمار شده با فنیل‌آلانین نسبت به گروه شاهد با گذشت زمان اثر مثبت‌تری بر شاخص طعم میوه‌ها گذاشتند، بطوری‌که بیشترین میزان شاخص طعم در زمان سوم و در تیمار ۴ میلی مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد. (شکل ۴). شاخص طعم یکی از شاخص‌های کیفی و مهم بازارپسندی می‌باشد که وابسته به دو شاخص اسیدیته قابل تیتراسیون و مواد جامد محلول می‌باشد. در صورتی‌که مواد جامد محلول میوه بالا رفته و اسیدیته قابل تیتراسیون آن کاهش یابد، شاخص طعم نیز افزایش می‌یابد.

pH: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، هیچ یک از فاکتورهای مدت زمان انبارمانی، تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین و اثر متقابل بین آنها اثر معنی‌داری بر میزان pH میوه نداشتند و مقدار اولیه آن (۴/۰۹) بود.



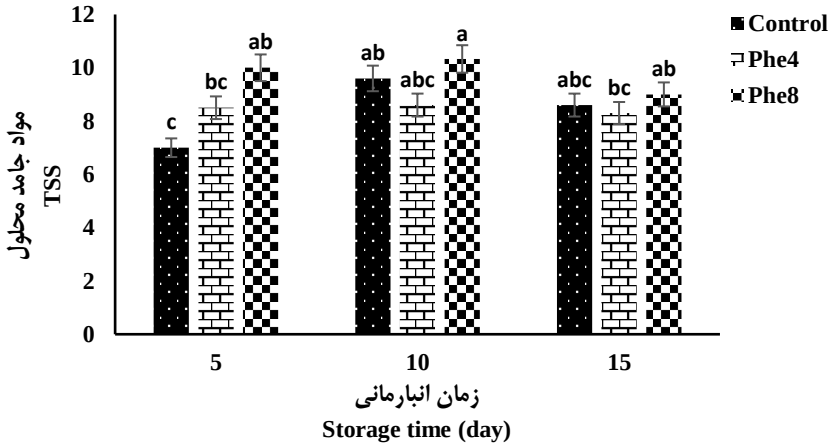
شکل ۱- اثر زمان انبارمانی بر شاخص *a (A) و Chroma (C) و تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر شاخص *b (B) رنگ میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 1- The effect of storage time on a* (A) and Chroma (C) and postharvest L-phenylalanine treatment on b* (B) of strawberry cv. Sabrina fruit during 15 days of storage (DMRT, *p≤0.05*)



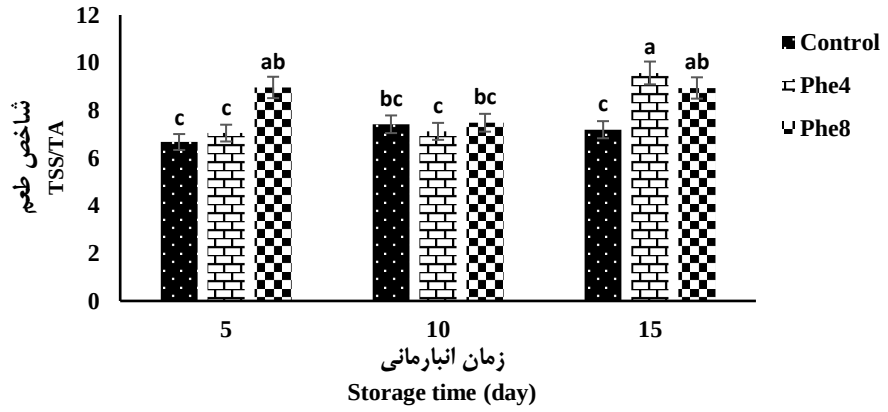
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر زمان انبارمانی بر میزان اسیدیته قابل تیتراسیون میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 2- The effect of storage time on the TA of strawberry cv. Sabrina fruit during 15 days of storage (DMRT, *p≤0.05*)



شکل ۳- اثر متقابل زمان انبارمانی × تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر مواد جامد محلول توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 3- The interaction effect of storage time ×postharvest treatment of L-phenylalanine on soluble solids of strawberry cv. Sabrina fruit during 15 days of storage (DMRT, *p≤0.05*)



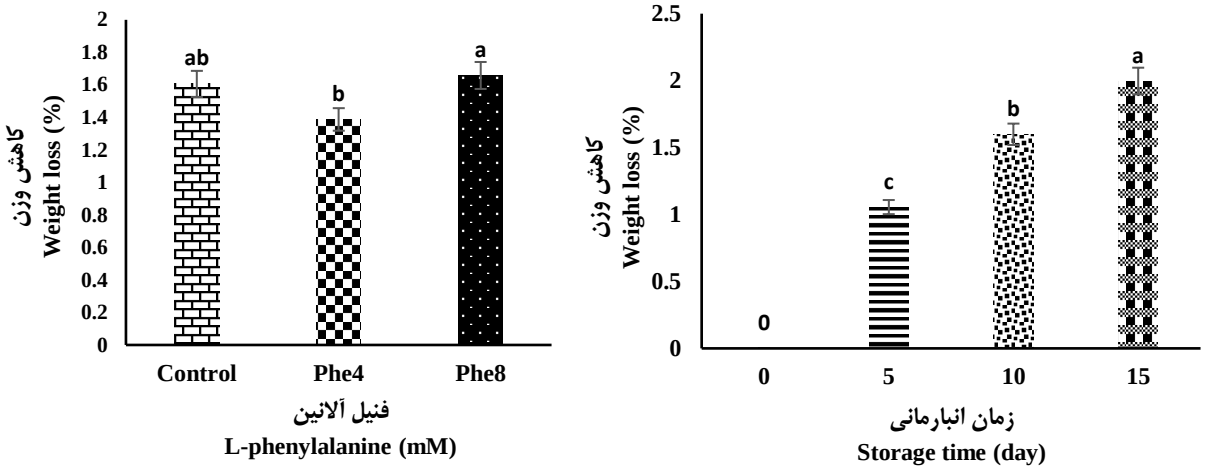
شکل ٤- اثر متقابل زمان انبارمانی × تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر شاخص طعم توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 4- The interaction effect of storage time ×postharvest treatment of L-phenylalanine on the strawberry cv. Sabrina fruit taste index during 15 days of storage (DMRT, $p \leq 0.05$)

کاهش وزن: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، اثر تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین و مدت زمان انبارمانی بر درصد کاهش وزن میوه به‌ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد معنی‌دار بود. البته اثر متقابل بین این دو معنی‌دار نبود. میزان کاهش وزن با مدت زمان انبارمانی ارتباط مستقیمی داشت و هر چه زمان انبارمانی بیشتر می‌شد درصد کاهش وزن میوه‌ها نیز افزایش یافت، بطوری‌که بیشترین درصد کاهش وزن در زمان ۱۵ روز مشاهده شد. همچنین کمترین درصد کاهش وزن در تیمار ۴ میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (شکل ۵). وزن میوه یکی از شاخص‌های مهم کیفیت میوه می‌باشد که به مرور زمان با توجه به شرایط نگهداری کاهش می‌یابد. در دوره پس از برداشت دو عامل مهم باعث از دست دادن آب و کاهش وزن محصول می‌شود: نخست قطع شدن رابط آبی میوه با گیاه مادری و دوم افزایش تعرق از سطح میوه که یک فرایند فیزیولوژیکی می‌باشد و منجر به از دست دادن رطوبت محصول می‌گردد (Treviño Garza *et al.*, 2015). یکی از ویژگی‌های بسیار مهم جهت ارزیابی کیفی محصول، کاهش وزن می‌باشد که به میزان تعرق و تنفس میوه مربوط می‌شود. میوه توت‌فرنگی به‌دلیل پوست نازک خود مستعد از دست دادن آب می‌باشد. این امر بر بازارپسندی محصول تأثیر منفی گذاشته و سبب نرم شدن بافت، تغییر در رنگ و عطر و طعم میوه، تسریع فرایند پیری، رشد پاتوژن‌ها و سرمازدگی می‌گردد (De Bruno *et al.*, 2023). با گذشت زمان انبارمانی و افزایش تبخیر و تعرق به دلیل یکسان نبودن فشار بخار آب در فضای بین سلولی بافت‌ها و اتمسفر احاطه کننده میوه از یک سو و نیز تشدید فرآیندهای تنفسی از سوی دیگر کاهش وزن میوه‌ها در طی زمان انبارمانی امری طبیعی می‌باشد (Faz *et al.*, 2016; Quintana *et al.*, 2021). احمدخانی و همکاران (۱۴۰۱) گزارش کردند که تیمار پس از برداشت فنیل آلانین باعث جلوگیری از کاهش وزن میوه زغال اخته می‌گردد. همچنین نجفی و همکاران (Najafi *et al.*, 2021) نیز مشاهده نمودند که تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین باعث جلوگیری از کاهش وزن بادنجان می‌شود. نتایج ما با نتایج این دو گزارش مطابقت دارد.

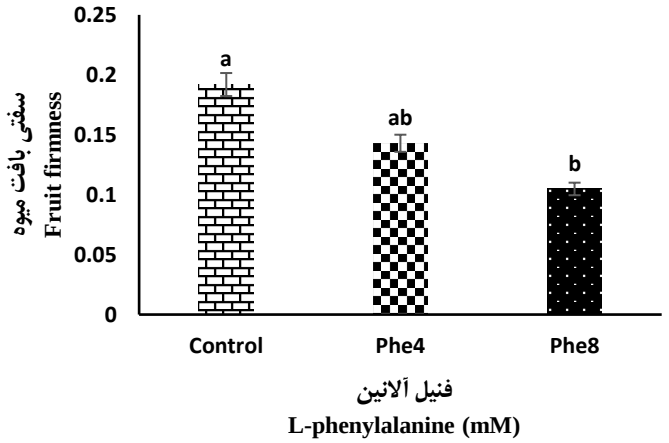
سفتی بافت میوه: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین در سطح احتمال ۵ درصد اثر معنی داری بر سفتی بافت میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' داشت. سفتی بافت میوه در تمامی تیمارها کاهش یافت اما تیمار ۴ میلی‌مولار فنیل‌آلانین نسبت به تیمار ۸ میلی‌مولار نرمی بافت میوه کمتری را نشان داد (شکل ۶). یکی از رایج‌ترین پارامترهای فیزیکی که برای ارزیابی فرآیند نرم شدن و رسیدن میوه استفاده می‌شود، سفتی میوه می‌باشد (Hong *et al.*, 2014). همچنین از شاخص‌های مهم جهت نگهداری میوه، مقبولیت توسط مصرف‌کننده و بازارپسندی محصولات باغبانی می‌باشد (Valero *et al.*, 2003). نرمی بافت میوه در اثر تغییرات در ساختار دیواره سلولی بخصوص کاهش همبستگی سلول به سلول، تغییرات در بافت و ساختار میوه به علت کاهش آب و حل شدن پکتین‌ها است (Perkins-Veazie, 1995). افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های درگیر در هیدرولیز دیواره سلولی در طی رسیدن و پس از برداشت باعث نرم شدن میوه می‌گردد که با تولید اتیلن مرتبط می‌باشند (Valero & Serrano, 2010). همچنین پراکسیداسیون لیپیدی غشاء بر اثر تخریب غشاء نیز سفتی بافت میوه را کاهش می دهد. رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن و سوپراکسید از محصولات حدواسط و نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء هستند که در فرآیند رسیدگی و نرم شدن بافت میوه نقش ویژه‌ای را ایفا می‌کنند (Mo *et al.*, 2008). در گزارش نجفی و همکاران (Najafi *et al.*, 2021) نیز فنیل‌آلانین سرعت نرم شدن بافت بادنجان را کاهش داد که با نتایج ما مطابقت دارد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، اثر متقابل بین مدت زمان انبارمانی و تیمار پس از برداشت فنیل آلانین بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان ظرفیت آنتی-اکسیدانی در زمان ۱۰ روز و در تیمار ۴ میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (شکل ۷). از آسیب‌های مهم بافتی که ممکن است در اثر قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش ها رخ دهد، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن آزاد است. تجمع بیش از حد ROS باعث کاهش سیالیت غشا، انتقال یونی، فعالیت آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها می‌گردد و در نهایت مرگ سلولی را به همراه خواهد داشت (Ranjbar Malidarreh *et al.*, 2019). بطور کلی افزایش ظرفیت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط مستقیمی با افزایش مدت زمان انبارمانی دارد (Sayyari & Gharibi, 2016Sowmyashree *et al.*, 2021;). در طی مطالعه‌ی مشاهده گردید که تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه انبه شد (Patel *et al.*, 2023). نتایج ما با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. بنابراین تیمار فنیل‌آلانین باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌گردد، القای فعالیت آنتی‌اکسیدانی احتمالاً تجمع ROS را کاهش می‌دهد، که به القای مسیر فنیل پروپانوئید مربوط می‌شود که منجر به تجمع فلاونوئیدهایی می‌شود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند.



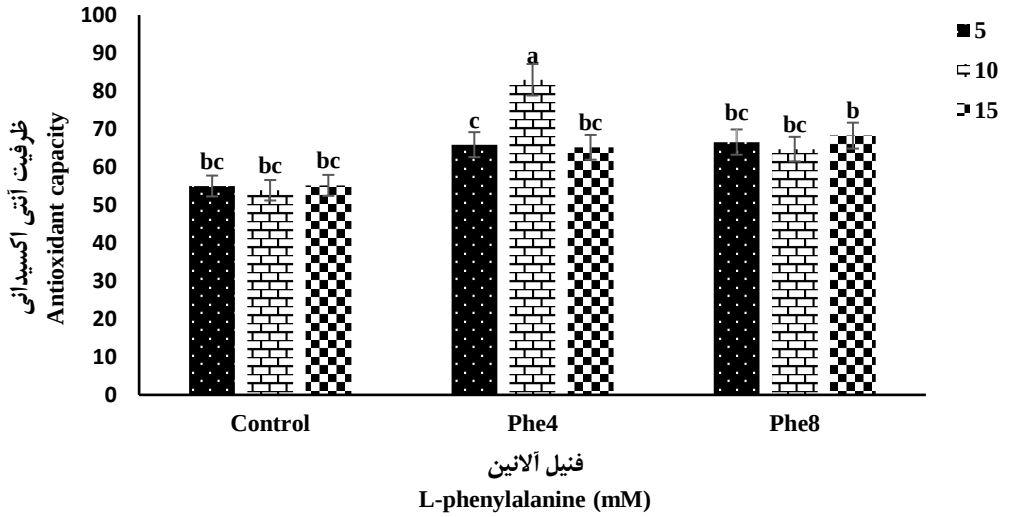
شکل ۵- اثر تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین و زمان انبارمانی بر کاهش وزن میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 5- The effect of postharvest L-phenylalanine treatment and storage time on weight loss of strawberry 'Sabrina' fruit during 15 days of storage (DMRT, *p≤0.05*)



شکل ٦- اثر تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر سفتی بافت میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 6- The effect of postharvest L-phenylalanine treatment on the firmness of the strawberry cv. Sabrina fruit tissue during 15 days of storage (DMRT, *p≤0.05*)

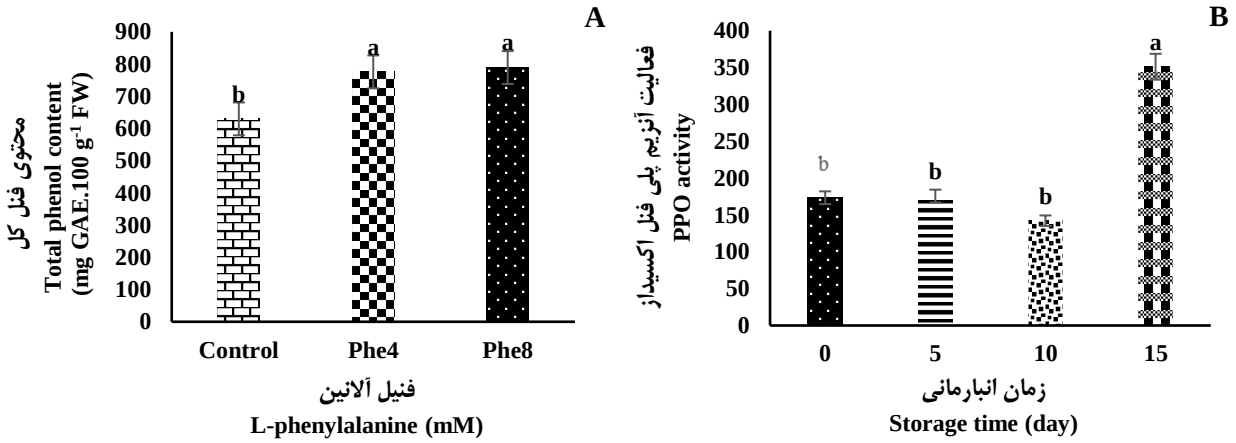


شکل ۷- اثر متقابل تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین × زمان انبارمانی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 7- The interaction effect of postharvest L-phenylalanine treatment and storage time on antioxidant capacity of strawberry cv. Sabrina fruit during 15 days of storage (DMRT, $p \leq 0.05$)

محتوی فنل کل: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری بر محتوی فنل کل میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' داشت. بیشترین میزان فنل کل در تیمار ۸ میلی‌مولار فنیل‌آلانین مشاهده شد (شکل ۸ A). مدت زمان انبارمانی و اثر متقابل بین مدت زمان انبارمانی و تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین اثر معنی‌داری بر محتوی فنل کل نداشتند. (جدول ۱). توت‌فرنگی یکی از میوه‌هایی است که به انواع سیستم‌های ضد اکسایشی غیر آنزیمی مانند ویتامین ث، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه مجهز می‌باشد (Aminifard *et al.*, 2013). فنل ترکیبی ساده با خواص مختلف است که به‌صورت طبیعی توسط گیاهان تولید می‌گردد. گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام رسان که نقش دفاعی مهمی را دارند، آزاد می‌نمایند. پژوهشی نشان می‌دهد که رابطه مثبتی میان میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (Ghasemnezhad *et al.*, 2011). فنل‌ها در مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌منظور بقاء و جلوگیری از صدمات مولکولی و آسیب‌های میکروارگانیسم‌ها، حشرات و گیاه خواران نقش دارند (Vaya *et al.*, 1997). احمدخانی و همکاران (Ahmadkhani *et al.*, 2023) گزارش کردند که تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین باعث افزایش محتوی فنل کل می‌شود که نتایج ما با این گزارش مطابقت دارد.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۱، مدت زمان انبارمانی در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' اثر معنی‌دار در سطح ۵ درصد گذاشت و بیشترین میزان فعالیت آنزیم PPO در زمان ۱۵ روز مشاهده شد (شکل ۸ B). اما تیمار پس از برداشت فنیل‌آلانین و اثر متقابل آن با مدت زمان انبارمانی اثر معنی‌داری نداشتند (جدول ۱). آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در تمامی بافت‌های گیاهی یافت می‌شود. سوبسترای آن ترکیبات فنلی حاوی یک حلقه آروماتیک با داشتن یک یا چندین گروه هیدروکسیل مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانیدین‌ها، تیروزین و سینامیک اسید است (Unal *et al.*, 2011). فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز توسط میزان تنفس، غلظت عناصر غذایی، استحکام بافت میوه و آنتی‌اکسیدان‌ها تنظیم می‌گردد و عواملی همچون زمان برداشت و دما، ترکیب گازی اتمسفر و شرایط محیطی نیز بر فعالیت آن مؤثر می‌باشد (Khoshghalb *et al.*, 2007). مکانیسم‌های مختلفی جهت مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن در موجودات زنده وجود دارد که یکی از مهمترین آنها سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی است. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو پاسخ خود را از طریق تولید آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی داده و از تخریب بیشتر سلول‌ها جلوگیری می‌کنند (Prassad, 1997; Van & Clijsters., 1990). بنابراین این آنزیم نقش مهمی در برابر پوسیدگی‌های قارچی دارد (Yang *et al.*, 2011).



شکل ۸- اثر تیمار پس از برداشت ال-فنیل‌آلانین بر محتوی فنل کل (A) و اثر زمان انبارمانی بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (B) میوه توت فرنگی در طی ۱۵ روز انبارمانی

Figure 8- The effect of post-harvest L-phenylalanine treatment on the content of total phenol (A) and the effect of storage time on the activity of PPO enzyme (B) of strawberry cv. Sabrina fruit during 15 days of storage (DMRT, $p \leq 0.05$)

نتیجه‌گیری

این مطالعه به بررسی شاخص‌های کیفی و کمی توت‌فرنگی تیمار شده با فنیل‌آلانین در طی نگهداری سرد پرداخت. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار پس از برداشت ال- فنیل‌آلانین تأثیر مثبتی در حفظ برخی از صفات کیفی میوه توت‌فرنگی رقم 'سابرینا' در طی دوره ۱۵ روزه انبارمانی داشت، به‌طوری‌که باعث افزایش شاخص b* رنگ، و محتوای فنل کل شده و همچنین با حفظ یکپارچگی غشای سلولی از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد به‌وسیله ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی و تحریک مسیر فعال فنیل‌پروپانوئید از کاهش وزن میوه‌ها جلوگیری کرد. همچنین اثر متقابل بین تیمار پس از برداشت ال- فنیل‌آلانین و مدت زمان انبارمانی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای مواد جامد محلول و شاخص طعم گردید که البته افزایش محتوای مواد جامد محلول ممکن است باعث کاهش عمر انبارمانی میوه شود. همچنین تیمار ال-فنیل‌آلانین نتوانست باعث کاهش سفتی میوه‌ها گردد. این پژوهش نشان داد که ما می‌توانیم از تیمار ال- فنیل‌آلانین به‌عنوان یک تیمار و روش مفید و سالم جهت حفظ برخی از ویژگی‌های کیفی میوه توت‌فرنگی طی انبارمانی در سردخانه استفاده نمائیم که البته نیاز به بررسی بیشتر می‌باشد، زیرا در برخی از شاخص‌ها تأثیر مثبتی نداشت.

References

1. Aghdam, M.S., Moradi, M., Razavi, F., & Rabiei, V. (2019). Exogenous phenylalanine application promotes chilling tolerance in tomato fruits during cold storage by ensuring supply of NADPH for activation of ROS scavenging systems. *Scientia Horticulturae, 246*, 818-25. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.074
2. Ahmadkhani, S., Soleimani, A., Razavi, F., & Khairi, A. (2023). The effect of post-harvest phenylalanine treatment on the physicochemical properties of cranberries during storage. *Journal of Iranian Horticultural Sciences, 53*(2), 295-308. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijhs.2022.325698.1943
3. Akhond, M., Heidarizadeh, F., & Kolahi, M. (2022). Comparative study of qualitative and chemical characteristics of Camarosa and Parus strawberry cultivars during 15 days of storage. *Developmental Biology, 14*(2), 43-52. https://doi.org/10.30495/jdb.2022.1941563.1270
4. Akhtar, A., Abbasi, N.A., & Hussain, A. (2010). Effect of calcium chloride treatments on quality characteristics of loguat fruit during storage. *Pakistan Journal of Botany, 42*, 181–188.
5. Aminifard, M., Aroiee, H., Azizi, M., Nemati, H., & Jaafar, H. (2013). Effect of compost on antioxidant components and fruit quality of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Central European Agriculture, 14*(2), 525-534. https://doi.org/10.5513/JCEA01/14.2.1232
6. Asghari, M., Azarsharif, Z., Tajik, H., & Farrokhzad, A. (2019). Effect of galbanum gum coating combined with cumin essential oil and calcium chloride on quality and shelf life of sweet cherry (cv. Siah Mashhad). *Journal of Horticultural Science, 32*(4), 665-680. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.343066.2028

7. Bishop, G., Styles, D., & Lens, P.N.L. (2021). Environmental performance of bioplastic packaging on fresh food produce: a consequential life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production, 317*, 128377. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128377
8. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248-254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999
9. Brizzolara, S., Manganaris, G.A., Fotopoulos, V., Watkins, C.B., & Tonutti, P. (2020). Primary metabolism in fresh fruits during storage. *Frontiers Plant Science, 11*, 1–16. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00080
10. Bustamante, C.A., Monti, L.L., Gabilondo, J., Scossa, F., Valentini, G., Budde, C.O., & Drincovich, M.F. (2016). Differential metabolic rearrangements after cold storage are correlated with chilling injury resistance of peach fruits. *Frontiers in Plant Science, 7*(September), 1–15. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01478
11. Cerdna, M., Snchez Snchez, A., Oliver, M., Juarez, M., & Snchez Andreu, J.J. (2009). Effect of foliar and root applications of amino acids on iron uptake by tomato plants. *Acta Horticulturae, 830*, 481-488. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.830.68
12. Chen, J., Mao, L., Mi, H., Zhao, Y., Ying, T., & Luo, Z. (2014). Detachment-accelerated ripening and senescence of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Akihime) fruit and the regulation role of multiple phytohormones. *Acta Physiologiae Plantarum, 36*(9), 2441–2451. https://doi.org/10.1007/s11738-014-1617-6
13. Chu, Y., Gao, C.C., Liu, X., Zhang, N., Xu, T., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., & Tang, X. (2020). Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion. *In: LWT, 122*, 109054. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109054
14. Daraei Garmakhany, A., Mirzaei, H., & Shakarami, K. (2021). Investigation of the effect of flower and leaf ethanolic extract of *Humulus lupulus* plant on the shelf life and quality attributes of strawberry fruits. *Journal of Food Science and Technology (Iran), 17*(109), 75-90. (In Persian). https://doi.org/10.52547/fsct.17.109.75
15. Davarpanah, J., Kiasat, A.R., Noorizadeh, S., & Ghahremani M. (2013). Nano magnetic double-charged diazoniabicyclo [2.2.2] octane dichloride silica hybrid: Synthesis, characterization, and application as an efficient and reusable organic–inorganic hybrid silica with ionic liquid framework for one-pot synthesis of pyran annulated heterocyclic compounds in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 376*, 78–89. https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.04.020
16. Du, G., Li, M., Ma, F., & Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry, 113*, 557-562. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.025
17. Erkan, M., & Selcuk, N. (2015). The effects of 1-MCP treatment on fruit quality of medlar fruit (*Mespilus germanica* L. cv. Istanbul) during long term storage in the palliflex storage system. *Postharvest Biology and Technology, 100*, 81–90. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.018
18. Faz, F.N., Mirdehghan, S.H., Karimi, H., & Alaei, H. (2016). Eeffect of thymol and menthol essential oils combined with packaging with celofan on the maintenance of postharvest quality of strawberry cv. Parus. *Iranian Journal of Horticultural Science, 47*(1), 81-91. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijhs.2016.58214
19. Garde-Cerdan, T., Santamaría, P., Rubio-Breton, P., Gonzalez-Arenzana, L., Lopez-Alfaro, I., & Lopez, R. (2014). Foliar application of proline, phenylalanine, and urea to tempranillo vines: Effect on grape volatile composition and comparison with the use of commercial nitrogen fertilizers. *LWT Food Science and Technology, 60*, 684-689. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.028
20. Ghasemnezhad, M., Nezhad, M.A., & Gerailoo, S. (2011). Changes in postharvest quality of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits influenced by chitosan. *Horticulture, Environment, and Biotechnology, 52*(1), 40-45. https://doi.org/10.1007/s13580-011-0028-5
21. Gol, N.B., Patel, P.R., & Rao, T.V.R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology Technology, 85*, 185–195. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008
22. Holler, M., Alberdi-Cedeno, J., Aunon-Lopez, A., Pointner, T., Martínez-Yusta, A., Konig, J., & Pignitter, M. (2023). Polylactic acid as a promising sustainable plastic packaging for edible oils. *Food Packag. Shelf Life 36*. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101051
23. Hong, K., Gong, D., Xu, H., Wang, S., Jia, Z., Chen, J., & Zhang, L. (2014). Effects of salicylic acid and nitric oxide pretreatment on the expression of genes involved in the ethylene signaling pathway and the quality of postharvest mango fruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 42*, 205-216. https://doi.org/10.1080/01140671.2014.892012
24. Jalili Marandi, R. (2013). *Postharvest physiology (handling and storage of fruits, vegetables, ornamental plants and medicinal plants)*. 4nd Ed., Jahad University Press, West Azerbaijan Branch, 624 P. (In Persian)

25. Khalifa, H., Barakat, H.A., El-mansy, S.A., & Soliman, S.A. (2016). Effect of chitosan–olive oil processing residues coatings on keeping quality of cold-storage strawberry (*Fragaria × ananassa var*. Festival). *39*, 504–515. https://doi.org/10.1111/jfq.12213
26. Khoshghalb, H., Arzani, K., Tavakoli, A., Malakouti, M.J., & Barzegar, M. (2008). Quality of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) fruit in relation to pre-harvest $CaCl_2$, Zn and B sprays, harvest time, ripening and storage conditions. *Acta Horticulturae*, *800*, 1027-1034. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.140
27. Kumar Patel, M., Maurer, D., Feygenberg, O., Ovadia, A., & Elad, Y. (2020). Oren-Shamir, M.; Alkan, N. Phenylalanine: A promising inducer of fruit resistance to postharvest pathogens. Foods, 9, 646. https://doi.org/10.3390%2Ffoods9050646
28. Meng, X., Li, B., Liu, J., & Tina, S. (2007). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, *106*, 501-508. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012
29. Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J., & Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during postharvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*, 2693-2699. https://doi.org/10.1002/jsfa.3395
30. Mohseni, F., Pakkish, Z., & Panahi, B. (2015). The role of foliar application of amino acids on vegetative and reproductive characteristics of strawberry (*Fragaria× ananassa*) cultivar Parous. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. (In Persian)
31. Najafi, R., Barzegar, T., Razavi, F., & Gharmani, Z. (2021). The effect of post-harvest treatments of phenylalanine and hydrogen sulfide on maintaining the quality and increasing the storage life of eggplant fruit (*Solanum melongena* L.). *Journal of Horticultural Sciences (Agricultural Sciences and Industries)*, *34*(4), 717-705. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v34i4.87237
32. Nakajima, J.I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *Biomed Research International*, 241-247. https://doi.org/10.1155%2FS1110724304404045
33. Patel, M.K., Fanyuk, M., Feyngenberg, O., Maurer, D., Sela, N., Ovadia, R., Orenshamir, M., & Alkan, N. (2023). Phenylalanine induces mango fruit resistance against chilling injuries during storage at suboptimal temperature. *Food Chemistry*, *405*, 134909. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134909
34. Pathare, P.B., Opara, L.U., & Al-Said, A.F. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed food: A review. *Food Bioprocess Technology*, *6*(1), 36-60. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9
35. Pelayo-Zaldivar, C., Ebeler, S.E., & Kader, A. (2005). Cultiver and harvest date effect on flavor and other quality attributes of California strawberries. *Journal of Food Quality*, *28*, 78-97. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00005.x
36. Perkins-Veazie, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews*, *17*(8), 267-297. https://doi.org/10.1002/9780470650585.ch8
37. Piechowiak, T., Antos, P., Kosowski, P., Skrobacz, K., Jozefczyk, R., & Balawejder, M. (2019). Impact of ozonation process on the microbiological and antioxidant status of raspberry (*Rubus ideaeus* L.) fruit during storage at room temperature. *Agriculture Food Science*, *28*(1), 35–44. https://doi.org/10.23986/afsci.70291
38. Pizzocaro, F., Torreggiani, D., & Gilardi, G. (1993). Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation*, *17*, 21 30. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1993.tb00223.x
39. Portu J., López-Alfaro I., Gómez-Alonso S., López R., & Garde-Cerdán T. (2015). Changes on grape phenolic composition induced by grapevine foliar applications of phenylalanine and urea. *Food Chemistery*, *180*, 171-180. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.042
40. Prassad, M.N.N. (1997). *Trace metals*, in: MNV Prasad plant ecophysiology, wiley, New York, pp: 207-249.
41. Quintana, S.E., Llalla, O., García-Risco, M.R., & Fornari, T. (2021). Comparison between essential oils and supercritical extracts into chitosan-based edible coatings on strawberry quality during cold storage. *The Journal of Supercritical Fluids*, *171*, 105198. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105198
42. Ranjbar Malidarreh, T., Askari Sarcheshmeh, M.A., Babalar, M., Shokri Heydari, H., & Ahmadi, A. (2019). Changes in some physiological and biochemical characteristics of plum (*Prunus salicina* cv. Flavor supreme pluot) affected by salicylic acid and iron pretreatment during storage with two different temperatures. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *55*(3), 525-539. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijhs.2019.278214.1620
43. Sayyari, M., & Gharibi, R. (2016). Effects of lavender essential oil and methyl salicylate on gray mold control and postharvest quality of strawberry. *Journal of Horticultural Science*, *29*(4), 662-670. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v29i4.42384

44. Shahimoridi, A., & Dastjerdi, A.M.M. (2020). The effects of ethanol extract of red mangrove and eucalyptus leaves on antioxidant capacity, enzyme activity and malondialdehyde of fresh banana fruit. *Journal of Food Researches*, *30*(1), 15-28. (In Persian)
45. Sogvar, O.B., Rabiei, V., Razavi, F., & Gohari, G. (2020). Phenylalanine alleviates postharvest chilling injury of plum fruit by modulating antioxidant system and enhancing the accumulation of phenolic compounds. *Food Technojogy & Biotechnology Original Scientific*, 1330-9862. https://doi.org/10.17113%2Fftb.58.04.20.6717
46. Sowmyashree, A., Sharma, R., Rudra, S.G., & Grover, M. (2021). Layer-by-Layer coating of hydrocolloids and mixed plant extract reduces fruit decay and improves postharvest life of nectarine fruits during cold storage. *Acta Physiologiae Plantarum*, *43*(8), 112. https://doi.org/10.1007/s11738-021-03256-8
47. Taherpour, L., Hosseinifarahi, M., & Radi, M. (2020). Application of pomegranate peel extract (PPE) with sodium alginate (Alg-Na) coating on fruit decay control and quality postharvest of sweet lemon fruit cv Mahali. *Journal of Food Technology and Nutrition*, *17*, 107-122. (In Persian)
48. Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I., & Murphy, A. (2017). Physiology and plant development. *Porto Alegre: Artmed*. 858.
49. Treviño Garza, M.Z., García, S., Del Socorro Flores González, M., & Arévalo Niño, K. (2015). Edible active coatings based on pectin, pullulan, and chitosan increase quality and shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Food Sciences*, *80*(8), 1823-1830. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12938
50. De Bruno, A., Gattuso, A., Ritorto, D., Piscopo, A., & Poiana, M. (2023). Effect of edible coating enriched with naturpal antioxidant extract and Bergamot essential oil on the shelf life of strawberries. *Foods*, *12*(3), 488. https://doi.org/10.3390/foods12030488
51. Unal, U.M., Yabaci, S.N., & Sener, A. (2011). Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from tea leaf (*Camellia sinensis*). *GIDA*, *36*(3), 137-144.
52. Valero, D., & Serrano, M. (2010). *Postharvest biology and technology for preserving fruit quality*. CRC-Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA. https://doi.org/10.1201/9781439802670
53. Valero, D., Martinez-Romero, A.D., Valverde, J.M., Guillen, F., & Serrano, M. (2003). Quality improvement and extension of shelf life by 1- methylcyclopropene in plumas affected by ripening stage at harvest. *Food Sciences Emergency and Technology*, *4*, 339–348. https://doi.org/10.1016/S1466-8564 (03)00038-9
54. Van Assche, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ*, *13*, 195–206. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01304.x
55. Vaya, J., Belinky, P.A., & Aviram, M. (1997). Antioxidant constituents from licorice roots: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, *23*(2), 302-313. https://doi.org/10.1016/s0891-5849 (97)00089-0
56. Yang, Z., Cao, S., Cai, Y., & Zheng, Y. (2011). Combination of salicylic acid and ultrasound to control postharvest blue mold caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *12*, 310-314. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.04.010

Contents

Research Articles

Effect of Plant Density and Planting Pattern on Growth and Physiological Characteristics of Tulip cv. ′Spryng′ **479**
D. Hashemabadi, B. Kaviani, K. Shakeri Kiasaraei, R. Onsinejad, M.R. Safari Motlagh

Symbiosis of Algal Endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 with Mexican Lime Seedlings under Salinity Stress Condition **493**
L. Baghazadeh Daryaii, D. Samsampour, A. Bagheri, J. Sohrabipour

The Effect of Plant Growth Promoting Bacteria in Hydroponics Cultivation Conditions on Iron Concentration, Yield and Phenolic Compounds of Lettuce **509**
P. Molaei, F. Nekounam, M. BabaAkbari Sari

Evaluating the Effect of the Rootstock on the Resistance of Some Grafted Pear Cultivars to the Fire Blight Disease **523**
J. Samimi, Y. Selahvarzi, A. Tehranifar, N. Beikzadeh

The Study of Drought Resistance in Different Ecotypes of Garlic Based on the Tolerance Indices in the Climatic Conditions of Hamedan **537**
M. Kakaei

Investigating the Use of Mycorrhiza and Trichoderma Fungi on Rhizome Yield and Active Ingredients of Ginger **553**
F. Rezvaninia, M.T. Ebadi, N. Safaie

Optimization of Tissue Culture Medium and the Combination of Growth Regulators to Increase Plantlet Production Efficiency in Walnut Micropropagation **565**
M. Ghorbani, K. Parvizi, M. Yazdandoost Hamedani, D. Hassani

Characterization of Melon Resistant Cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Based on Morphological Traits and R Gene Patterns **579**
F. Shokouhifar, M. Mamarabadi, S. Toosi

Effect of Different Rootstocks on Morphological, Phytochemical and Molecular Indicators of ‘Thomson Navel’ Orange Fruit at Commercial Maturity **599**
F. Ahmadi, M.M. Sharifani, A. Mousavi, N. Akhlaghi Amiri, M. Khoshhal Sarmast, Kh. Zaynali Nezhad

Postharvest L-phenylalanine Application on Shelf life and Physicochemical Characteristics of Sabrina Strawberry During Cold Storage **611**
K. Manda-Hakki, H. Hassanpour

HORTICULTURAL SCIENCES

(AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY)

Vol. 38 No. 3 2024

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:

Arouiee, H.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Abedi, B.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Tehranifar,A.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Shoor, M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Haghighi, M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Isfahan University of Technology.
Hassanzadeh Mobini , S	Phytotron Facility Manager	Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Queen's University ،Kingston, Canada
Khanizadeh,SH.	Research Scientist	Bioproducts and Bioprocesses, Agriculture and Agri-Food Canada.
Khazaei, H	Plant Breeding	Plant Breeding, AVRDC - The World Vegetable Center.
Davarynejad, GH.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
M. Rahemi	Horticultural Sciences	Prof. Shiraz University.
Zamani, Z.	Horticultural Sciences	Prof. University of Tehran, Iran.
Sharifani, M.M.	Horticultural Sciences	Asso.Prof. Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources.
Azizi, M.	Medicinal Plants	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.
Fujii, Y.		Tokyo University of Agriculture and Technology, International Environmental and Agricultural Sciences

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad.

Address: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

P.O.BOX: 91775- 1163

Tel: +98-0511- 38804621

Fax: +98-0511- 8787430

E-Mail: Jhorts4@um.ac.ir

Web Site: https://jhs.um.ac.ir

Ferdowsi University of Mashhad

Vol. 38 No. 3

2024

Journal of Horticultural Science

(Agricultural Science and Technology)

Iranian Scientific Association for Landscape ISAL

ISSN: 2008-4730

Contents

Effect of Plant Density and Planting Pattern on Growth and Physiological Characteristics of Tulip cv. 'Spryng' 479
D. Hashemabadi, B. Kaviani, K. Shakeri Kiasaraei, R. Onsinejad, M.R. Safari Motlagh

Symbiosis of Algal Endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 with Mexican Lime Seedlings under Salinity Stress Condition 493
L. Baghazadeh Daryaii, D. Samsampour, A. Bagheri, J. Sohrabipour

The Effect of Plant Growth Promoting Bacteria in Hydroponics Cultivation Conditions on Iron Concentration, Yield and Phenolic Compounds of Lettuce 509
P. Molaei, F. Nekounam, M. BabaAkbari Sari

Evaluating the Effect of the Rootstock on the Resistance of Some Grafted Pear Cultivars to the Fire Blight Disease 523
J. Samimi, Y. Selahvarzi, A. Tehranifar, N. Beikzadeh

The Study of Drought Resistance in Different Ecotypes of Garlic Based on the Tolerance Indices in the Climatic Conditions of Hamedan 537
M. Kakaei

Investigating the Use of Mycorrhiza and Trichoderma Fungi on Rhizome Yield and Active Ingredients of Ginger 553
F. Rezvaninia, M.T. Ebadi, N. Safaie

Optimization of Tissue Culture Medium and the Combination of Growth Regulators to Increase Plantlet Production Efficiency in Walnut Micropropagation 565
M. Ghorbani, K. Parvizi, M. Yazdandoost Hamedani, D. Hassani

Characterization of Melon Resistant Cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Based on Morphological Traits and R Gene Patterns 579
F. Shokouhifar, M. Mamarabadi, S. Toosi

Effect of Different Rootstocks on Morphological, Phytochemical and Molecular Indicators of 'Thomson Navel' Orange Fruit at Commercial Maturity 599
F. Ahmadi, M.M. Sharifani, A. Mousavi, N. Akhlaghi Amiri, M. Khoshhal Sarmast, Kh. Zaynali Nezhad

Postharvest L-phenylalanine Application on Shelf life and Physicochemical Characteristics of Sabrina Strawberry During Cold Storage 611
K. Manda-Hakki, H. Hassanpour