

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

رساله دکتری مهندسی زراعت

تأثیر امواج فراصوتی، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بر رشد و برخی از  
خصوصیات کیفی استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni L.*) و سرخارگل (*Echinacea*  
*purpurea L.*)

نگارنده: سیده فاطمه رسولی

استاد راهنما: دکتر منوچهر قلی پور

اساتید مشاور

دکتر کامبیز جهان بین.

دکتر حمیدرضا اصغری.

شهریور ۱۳۹۷

## تقدیم اثر

ارزشمندترین نعمت‌های پروردگار که با گرمی آفتاب وجودشان و دریای زلال محبتشان موجب رشد و هدایت‌

شدند

پدر، مادر، برادر و خواهرم

و

به همه آنان که تحصیل علم و آموزش آن را به دیگران راد میرتحتق آرمان‌های الهی و در جهت اعتلای

جامعه در مسیر سازندگی و پیشرفت بکار می‌گیرند.

# شکر و قدردانی

الهی اصطلاحات انباشته را دانش پنداشته ایم "یا نور السموات و الارض" قلب ما را مورد مشیت "العلم یقذفه الله فی قلب من یشای" قرار ده. "الهی نامه علامه حسن زاده آملی"

سپاس بیکران خدای مهربان را به خاطر الطاف و یثه اش که دوباره در مسیر زندگی ام چراغ فروزان دیگری را برای راهنمایی و هدایتیم قرار داد و نعمت بیشتر دانستن و فهمیدن ارزانی داشت. در طی این مسیر، همفرانی را، بهرم بودن که حضورشان، همچون ستارگانی پر نور فروزنده را هم بود و از این رو بر خود واجب می دانم مراتب بی پایان سپاس و تقدیرم را نشان نمایم.

از پدر، مادر، برادر و خواهر عزیزم که همواره مرا یاری داده اند صمیمانه سپاسگزار می نمایم.

از استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر قلی پور که این فرصت را در اختیارم قرار داده اند، تشکر می نمایم.

تشکر ویژه ام را اثار استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر فرشید قادری فر که همه ی آنچه از پوشیمی آموخته ام مدیون و مرهون لطف ایشان می باشد می نمایم.

از جناب آقای دکتر جهان بین و جناب آقای دکتر اصنفری که زحمت مشاوره این پایان نامه را بر عهده داشتند تشکر می نمایم.

از جناب آقای مهندس شاکری، مطهری نژاد و خانم آموزگار مسئولین آزمایشگاه های خاک و زراعت کمال تشکر را دارم.

# تعمدنامه

اینجانب **سیده فاطمه رسولی** دانشجوی دوره دکتری رشته زراعت-اکولوژی گیاهان زراعی. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تأثیر امواج فراصوتی، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بر رشد و برخی از خصوصیات کیفی استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni L.*) و سرخارگل (*Echinacea purpurea L.*) تحت راهنمایی دکتر قلی پور متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

## تاریخ

### امضای دانشجو

#### مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود. استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## حکیده

یکی از روش‌های بیوفیزیکی پرایمینگ بذر، پیش‌تیمار بذرها با امواج فراصوتی می‌باشد. ضربه‌های ممتد امواج فراصوت سبب افزایش نفوذپذیری پوسته بذر و تسریع در جذب آب و بالا رفتن دمای بافت‌ها می‌شود. بالا رفتن دما و سرعت آماس بذرها پیش‌تیمار شده با تسریع تغییرات در متابولیسم جوانه‌زنی بذر همراه می‌باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش مطالعه‌ی اثر پیش‌تیمار امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های مهم جوانه‌زنی بذر سرخارگل بود. این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۶ در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ۵ مدت اعمال تیمار امواج فراصوتی ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک بود. نتایج این آزمایش نشان داد که اثر پیش‌تیمار بذرها با امواج فراصوتی بر تمام صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه در مدت تیمار ۱۵ دقیقه حاصل گردید. بیشترین میزان سرعت جوانه‌زنی و کارایی استفاده از ذخایر بذر در مدت‌های تیمار ۱۵ و ۲۵ دقیقه بدست آمد. امواج فراصوت سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا‌آمیلاز، پروتئاز، الکل‌دهیدروژناز، گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز، گلوکاتایون ردوکتاز، قندها و پروتئین‌ها، در بیشتر مدت‌های اعمال تیمار امواج فراصوتی نسبت به شاهد گردید. بهترین مدت اعمال تیمار امواج فراصوتی که هم سبب بهبود خصوصیات جوانه‌زنی و هم بهبود خصوصیات بیوشیمیایی بذرها سرخارگل گردید، ۱۵ دقیقه بود.

به منظور کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی گیاه سرخارگل نسبت به دما و رطوبت، واکنش جوانه‌زنی این گیاه تحت تیمارهای دمایی (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ °C) و پتانسیل آب در چهار سطح (۰، ۳-، ۶- و ۹- بار)، به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر دما، پتانسیل آب و اثر متقابل آنها بر درصد و سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار بود. با ارزیابی سه مدل رگرسیون

غیرخطی شامل مدل دوتکه‌ای، دندان مانند و بتای اصلی، مدل دو تکه‌ای به‌عنوان مدل برتر انتخاب شد. دماهای کاردینال حاصله عبارت بودند از دمای پایه  $17/02^{\circ}\text{C}$ ، دمای مطلوب  $23/8^{\circ}\text{C}$  و دمای سقف  $43/3^{\circ}\text{C}$ . تعداد ساعت بیولوژیک برای جوانه‌زنی در پتانسیل صفر  $84/5$  ساعت بود.

اسید سالیسیلیک و جاسمونات‌ها (الیسیتور شیمیایی) به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود بسیار مورد توجه می‌باشند. استعمال خارجی این ترکیبات باعث القا تنش کاذب در گیاه شده و پاسخ‌های دفاعی گیاه را بر می‌انگیزد. گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را زیاد نموده و بدنبال آن، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی (که اغلب ارزش دارویی دارند) افزایش پیدا می‌کند. پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر آنزیم‌های محرک تنش اکسیداتیو، دفاعی و برخی مواد موثره، عملکرد و اجزای عملکرد در سرخارگل و استویا در شرایط مزرعه‌ای صورت گرفت. آزمایش حاضر در سال زراعی  $1394-1395$  در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود در سه تکرار و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک با چهار غلظت (۰، ۵، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک با سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و محلول‌پاشی هر دوی آن‌ها با فاصله زمانی ۱۰ روز از زمان ورود به فاز زایشی (سرخارگل) و بعد از استقرار در مرحله‌ی رویشی (استویا) آغاز و در سه نوبت تکرار گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که محلول‌پاشی بر صفات اندازه‌گیری شده با اطمینان ۹۹ درصد اثرگذار بوده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در تیمار 20ja-1 sa سرخارگل مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از جمله SOD در بیشتر تیمارها افزایش یافت. میزان ترکیبات غیرآنزیمی از جمله فنل کل، فلانوئید، و آنتوسیانین نیز در اغلب تیمارهای سرخارگل افزایش یافت. این ترکیبات که ترکیباتی فنیل‌پروپانوئیدی می‌باشند به موازات افزایش آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لیاز افزایش یافتند. بیشترین میزان فنل در برگ در تیمار 50ja با میانگین حدود  $38/8$  میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید.

محلول پاشی سبب کاهش میزان کلروفیل a و b در بیشتر تیمارهای استویا نسبت به شاهد شد، اما کارتنوید در ۹ تیمار نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در برخی از تیمارها افزایش پیدا کرد، میزان اغلب آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی افزایش پیدا کرد، میزان فنل در اغلب تیمارها، فلانوئید و فلاونول در همه‌ی تیمارها افزایش پیدا کرد. علی‌رغم کاهش میزان کلروفیل احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و بهبود شرایط، بیشترین میزان وزن خشک برگ در تیمارهای 20ja-0.5 sa، 20ja-1sa، 50ja-0.5 sa و 50ja-1sa با میانگین حدود ۴/۶ تن در هکتار به دست آمد. میزان استویوزاید و ریبودیوزاید A سه تیمار اندازه‌گیری شد که در غلظت ۲۰ ja میزان تولید گلیکوزید ریبودیوزاید A بیشتر بود. اسید جاسمونیک توانست در میزان گلیکوزیدها تغییر ایجاد نماید و میزان مطلوب‌ترین ترکیب استویا را افزایش دهد از این رو استفاده از آن جهت افزایش ریبودیوزاید A توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: امواج فراصوتی، اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک، استویا، سرخارگل.



# لیست مقالات مترجم از پایان نامه

- ۱- اثر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در القای تنش اکسیداتیو، افزایش مقاومت و عملکرد در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) چاپ در مجله‌ی پژوهش‌های تولید گیاهان زراعی گرگان جلد ۲۵، شماره ۱ ۱۳۹۷
- ۲- اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر برخی آنتی‌اکسیدان‌ها، قند کل و پراکسیداسیون لیپید در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در شرایط مزرعه‌ای پذیرش از
- ۳- اثر جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بر عملکرد و برخی اجزای عملکرد سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) پذیرش از همایش ملی گیاهان دارویی (تحقیقات، تولید و فرآوری)، ۱۸ و ۱۹ اسفند ۱۳۹۵- دانشگاه صنعتی شاهرود- دانشکده کشاورزی.
- ۴- اثر محلول پاشی جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بر برخی عوامل روزنه‌ای و محتوای رطوبت نسبی برگ در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) پذیرش از همایش ملی گیاهان دارویی (تحقیقات، تولید و فرآوری)، ۱۸ و ۱۹ اسفند ۱۳۹۵- دانشگاه صنعتی شاهرود- دانشکده کشاورزی.

## فصل اول: مقدمه و کلیات

- ۱-۱ پیش تیمار، امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی ..... ۲
- ۱-۱-۱ اهمیت جوانه‌زنی ..... ۲
- ۲-۱-۱ گیاهشناسی سرخارگل ..... ۲
- ۳-۱-۱ بذرهاى سرخارگل و جوانه‌زنی ..... ۳
- ۴-۱-۱ استراتیجی‌های کاسیون و جوانه‌زنی ..... ۳
- ۵-۱-۱ تناوب دمایی و جوانه‌زنی ..... ۳
- ۶-۱-۱ امواج فراصوتی و جوانه‌زنی ..... ۴
- ۷-۱-۱ فرآیندهای بیوشیمیایی جوانه‌زنی و امواج فراصوتی ..... ۴
- ۸-۱-۱ هدف پژوهش ..... ۵
- ۲-۱ ارزیابی مدل‌های رگرسیون غیرخطی برای کمی کردن سرعت جوانه‌زنی سرخارگل ..... ۶
- ۱-۲-۱ جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه ..... ۶
- ۲-۲-۱ مزایای استفاده از مدل‌سازی ..... ۶
- ۳-۲-۱ دماهای کاردینال و اهمیت آنها ..... ۷
- ۴-۲-۱ کاربرد دماهای کاردینال ..... ۷
- ۵-۲-۱ مدل‌های ریاضی و جوانه‌زنی ..... ۷
- ۶-۲-۱ اهداف ..... ۸
- ۳-۱ اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در استویا و سرخارگل مزرعه‌ای ..... ۹
- ۱-۳-۱ گیاهشناسی سرخارگل ..... ۹
- ۲-۳-۱ اهمیت سرخارگل ..... ۹
- ۳-۳-۱ ترکیبات مهم سرخارگل ..... ۱۰
- ۴-۳-۱ اهمیت اقتصادی سرخارگل ..... ۱۰
- ۵-۳-۱ الیستورها و متابولیت ثانویه ..... ۱۰
- ۶-۳-۱ الیستورها (القاکننده‌ی تنش کاذب در گیاه) و فعال شدن سیستم‌های دفاعی در گیاه ..... ۱۱
- ۷-۳-۱ ترکیبات فنیل پروپانوییدی ..... ۱۲
- ۸-۳-۱ اهداف ..... ۱۳

- ۱-۳-۹ مبدأ و گیاهشناسی استویا ..... ۱۴
- ۱-۳-۱۰ اهمیت استویا ..... ۱۵
- ۱-۳-۱۱ نیازهای اکولوژیکی استویا ..... ۱۵
- ۱-۳-۱۲ ترکیبات استویا ..... ۱۶
- ۱-۳-۱۳ کشورهای تولیدکننده‌ی استویا ..... ۱۶
- ۱-۳-۱۴ فرضیات و اهداف ..... ۱۷

### فصل دوم: بررسی منابع

- ۱-۲-۱ پیش‌تیمار امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی ..... ۲۰
- ۱-۲-۱-۱ اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد ..... ۲۰
- ۱-۲-۲ جوانه‌زنی و ذخایر هتروتروفی ..... ۲۱
- ۱-۲-۳ آنزیم‌آلفا‌آمیلاز، قندهای محلول و جوانه‌زنی ..... ۲۱
- ۱-۲-۴ آنزیم‌الکل‌دهیدروژناز و جوانه‌زنی ..... ۲۲
- ۱-۲-۵ آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز و جوانه‌زنی ..... ۲۳
- ۱-۲-۶ تغییرات بیوشیمیایی و استراتیغیکاسیون ..... ۲۳
- ۱-۲-۷ پروتئین‌های ذخیره‌ای و جوانه‌زنی ..... ۲۴
- ۱-۲-۸ آنزیم پروتئاز و جوانه‌زنی ..... ۲۴
- ۱-۲-۹ آنزیم آرژیناز و جوانه‌زنی ..... ۲۵
- ۲-۲ ارزیابی مدل‌های رگرسیون غیرخطی برای کمی کردن سرعت جوانه‌زنی سرخارگل ..... ۲۷
- ۲-۲-۱ اهمیت جوانه‌زنی و سبز شدن ..... ۲۷
- ۲-۲-۲ اهمیت پیش‌بینی زمان سبز شدن ..... ۲۷
- ۲-۲-۳ مدل‌ها و شبیه‌سازی ..... ۲۸
- ۲-۲-۴ توابع جوانه‌زنی ..... ۲۹
- ۲-۲-۵ اثر دما بر سبز شدن و جوانه‌زنی ..... ۳۰
- ۲-۲-۶ تأثیر رطوبت بر جوانه‌زنی و سبز شدن ..... ۳۲

- ۳-۲ اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در استویا و سرخارگل مزرعه‌ای ..... ۳۴
- ۱-۳-۲ اسید جاسمونیک ..... ۳۴
- ۲-۳-۲ اسید سالیسیلیک ..... ۳۴
- ۳-۳-۲ اسید جاسمونیک و سالیسیلیک و متابولیت‌های ثانویه ..... ۳۵
- ۴-۳-۲ اسید جاسمونیک و سالیسیلیک و رشد گیاه ..... ۳۶

### فصل ۳: مواد و روش‌ها

- ۱-۳ پیش تیمار امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی ..... ۳۸
- ۱-۱-۳ معرفی طرح آزمایشی اول ..... ۳۸
- ۲-۱-۳ استخراج عصاره آنزیم آلفاآمیلاز ..... ۳۹
- ۳-۱-۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز ..... ۳۹
- ۴-۱-۳ استخراج قندها ..... ۳۹
- ۵-۱-۳ اندازه‌گیری قند کل ..... ۳۹
- ۶-۱-۳ اندازه‌گیری قندهای احیایی ..... ۳۹
- ۷-۱-۳ اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی ..... ۴۰
- ۸-۱-۹ اندازه‌گیری کلروفیل ..... ۴۰
- ۹-۱-۳ اندازه‌گیری هدایت الکتریکی ..... ۴۰
- ۱۰-۱-۳ استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن ..... ۴۰
- ۱۱-۱-۳ استخراج عصاره فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز ..... ۴۰
- ۱۲-۱-۳ تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ..... ۴۱
- ۱۳-۱-۳ تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز ..... ۴۱
- ۱۴-۱-۳ تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ..... ۴۱
- ۱۵-۱-۳ استخراج عصاره گلوکاتایون S ترانسفراز ..... ۴۲
- ۱۶-۱-۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون S ترانسفراز ..... ۴۲
- ۱۷-۱-۳ استخراج عصاره آنزیم الکل دهیدروژناز ..... ۴۲
- ۱۸-۱-۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز ..... ۴۳
- ۱۹-۱-۳ استخراج عصاره آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز ..... ۴۳
- ۲۰-۱-۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز ..... ۴۴

- ۳-۱-۲۱ استخراج عصاره آنزیم آرژیناز ..... ۴۴
- ۳-۱-۲۲ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آرژیناز ..... ۴۵
- ۳-۱-۲۳ استخراج عصاره آنزیم پروتئاز ..... ۴۵
- ۳-۱-۲۴ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز ..... ۴۵
- ۳-۱-۲۵ استخراج عصاره آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز ..... ۴۶
- ۳-۱-۲۶ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز ..... ۴۶
- ۳-۱-۲۷ استخراج پروتئین محلول ..... ۴۶
- ۳-۱-۲۷-۱ تهیه بافر استخراج پروتئین محلول ..... ۴۶
- ۳-۱-۲۷-۲ تهیه معرف برادفورد ..... ۴۶
- ۳-۱-۲۷-۳ تهیه نمودار استاندارد پروتئین محلول ..... ۴۷
- ۳-۱-۲۸ اندازه‌گیری پروتئین محلول ..... ۴۸
- ۳-۱-۲۹ مواد و محلول‌های مورد نیاز استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل ..... ۴۷
- ۳-۱-۲۹-۱ تهیه بافر نمونه ..... ۴۸
- ۳-۱-۲۹-۲ تهیه نمودار استاندارد پروتئین کل ..... ۴۹
- ۳-۱-۳۰ استخراج پروتئین کل ..... ۵۰
- ۳-۱-۳۱ اندازه‌گیری پروتئین کل ..... ۵۰
- ۳-۱-۳۲ طرح آزمایشی ۲ و مشخصات طرح ..... ۵۱
- ۳-۱-۳۳ طرح آزمایشی ۳ ..... ۵۲
- ۳-۲ ارزیابی مدل‌های رگرسیون غیرخطی برای کمی کردن سرعت جوانه‌زنی سرخارگل ..... ۵۳
- ۳-۲-۱ مواد و روش ..... ۶۷
- ۳-۳ اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در استویا و سرخارگل مزرعه‌ای ..... ۵۶
- ۳-۳-۱ معرفی گیاه سرخارگل ..... ۵۶
- ۳-۳-۲ مشخصات جغرافیایی و اقلیمی محل اجرای آزمایش سرخارگل ..... ۵۶
- ۳-۳-۳ مشخصات خاک محل مورد آزمایش سرخارگل ..... ۵۶
- ۳-۳-۴ اجرای طرح آزمایشی سرخارگل ..... ۵۷
- ۳-۳-۵ مراقبت زراعی سرخارگل ..... ۵۸

- ۵۸ ..... ۶-۳-۳ اعمال تیمار و نمونه برداری سرخارگل
- ۵۹ ..... ۷-۳-۳ معرفی استویا
- ۵۹ ..... ۸-۳-۳ مشخصات جغرافیایی و اقلیمی محل اجرای آزمایش استویا
- ۵۹ ..... ۹-۳-۳ مشخصات خاک محل مورد آزمایش استویا
- ۵۹ ..... ۱۰-۳-۳ مراقبت زراعی استویا
- ۶۰ ..... ۱۱-۳-۳ اجرای طرح آزمایشی استویا
- ۶۰ ..... ۱۲-۳-۳ اعمال تیمار و نمونه برداری استویا
- ۶۰ ..... ۱۳-۳-۳ استخراج عصاره آنزیم NADPH اکسیداز و سوپراکسیددسموتاز
- ۶۱ ..... ۱۴-۳-۳ اندازه گیری فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز
- ۶۱ ..... ۱۵-۳-۳ اندازه گیری فعالیت آنزیم SOD
- ۶۱ ..... ۱۶-۳-۳ استخراج پراکسید هیدروژن
- ۶۲ ..... ۱۷-۳-۳ اندازه گیری پراکسید هیدروژن
- ۶۲ ..... ۱۸-۳-۳ استخراج و اندازه گیری پراکسیداسیون لیپید
- ۶۳ ..... ۱۹-۳-۳ استخراج عصاره آنزیم آسکوربات پراکسیداز
- ۶۳ ..... ۲۰-۳-۳ اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
- ۶۴ ..... ۲۱-۳-۳ اندازه گیری آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز
- ۶۴ ..... ۲۲-۳-۳ استخراج و اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز
- ۶۵ ..... ۲۳-۳-۳ استخراج و اندازه گیری فنل کل
- ۶۶ ..... ۲۴-۳-۳ تعیین میزان فلانوئید کل
- ۶۷ ..... ۲۵-۳-۳ سنجش میزان آنتوسیانین
- ۶۷ ..... ۲۶-۳-۳ سنجش میزان اسید آسکوربیک
- ۶۸ ..... ۲۷-۳-۳ استخراج قندهای محلول
- ۶۸ ..... ۱-۲۷-۳-۳ تهیه معرف آنترون
- ۶۹ ..... ۲-۲۷-۳-۳ تهیه معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید
- ۶۹ ..... ۳-۲۷-۳-۳ تهیه نمودار استاندارد قند کل
- ۷۱ ..... ۲۸-۳-۳ اندازه گیری قند کل
- ۷۱ ..... ۲۹-۳-۳ اندازه گیری قندهای احیایی
- ۷۱ ..... ۱-۲۹-۳-۳ تهیه نمودار استاندارد قندهای احیایی

۷۲.....	۳-۳-۳۰ اندازه‌گیری قندهای غیر احیایی
۷۳.....	۳-۳-۳۰-۱- تهیه نمودار استاندارد قندغیراحیایی
۷۴.....	۳-۳-۳۱ استخراج و اندازه‌گیری نشاسته
۷۵.....	۳-۳-۳۲ اندازه‌گیری کلروفیل
۷۵.....	۳-۳-۳۳ اندازه‌گیری نفوذپذیری غشای
۷۶.....	۳-۳-۳۴ اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ
۷۶.....	۳-۳-۳۵ اندازه‌گیری هدایت روزنه‌ای برگ
۷۶.....	۳-۳-۳۶ استخراج و اندازه‌گیری گلیکوزیدها

#### فصل چهار: نتایج و بحث

۸۰.....	۴-۱-۱ پیش تیمار امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی
۸۰.....	۴-۱-۱-۱. درصد و سرعت جوانه‌زنی
۸۱.....	۴-۱-۲. کارایی استفاده از ذخایر بذر
۸۱.....	۴-۱-۳. وزن خشک گیاهچه
۸۲.....	۴-۱-۴. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز
۸۳.....	۴-۱-۵. قند کل
۸۳.....	۴-۱-۶. روند تغییرات قندهای احیایی و غیراحیایی
۸۴.....	۴-۱-۷ نسبت قندهای احیایی به غیراحیایی
۸۵.....	۴-۱-۸. فعالیت آنزیم پروتئاز
۸۶.....	۴-۱-۹. روند تغییرات پروتئین محلول و کل
۸۷.....	۴-۱-۱۰. فعالیت الکل‌دهیدروژناز
۸۸.....	۴-۱-۱۱. فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز
۸۹.....	۴-۱-۱۲. فعالیت آنزیم آرژیناز
۹۰.....	۴-۱-۱۳. پراکسیدهاییدروژن
۹۰.....	۴-۱-۱۴. هدایت الکتریکی
۹۱.....	۴-۱-۱۵. گایاکول پراکسیداز
۹۱.....	۴-۱-۱۶. کاتالاز
۹۲.....	۴-۱-۱۷. گلوکاتیون S - ترانسفراز

- ۹۳ ..... ۱-۴-۱۸. پلی فنل اکسیداز
- ۹۴ ..... ۱-۴-۱۹. گلوکاتینون ردوکتاز
- ۹۵ ..... ۱-۴-۲۰. کلروفیل a و b
- ۹۶ ..... ۱-۴-۲۱. درصد جوانه زنی
- ۹۷ ..... ۱-۴-۲۲. سرعت تا پنجاه درصد جوانه زنی
- ۹۷ ..... ۱-۴-۲۳. طول ریشه چه و گیاهچه
- ۹۹ ..... ۱-۴-۲۴. وزن خشک گیاهچه
- ۱۰۰ ..... ۱-۴-۲۵. کسر ذخایر مصرف شده و کارایی استفاده از ذخایر بذری
- ۱۰۱ ..... ۱-۴-۲۶. میزان استفاده از ذخایر بذری
- ۱۰۲ ..... ۱-۴-۲۷. قدرت بذر
- ۱۰۴ ..... ۱-۴-۲۸. درصد جوانه زنی
- ۱۰۴ ..... ۱-۴-۲۹. سرعت و یکنواختی جوانه زنی
- ۱۰۵ ..... ۱-۴-۳۰. قند کل و پروتئین محلول
- ۱۰۵ ..... ۱-۴-۳۱. نتیجه گیری کلی
- ۱۰۶ ..... ۱-۴-۳۲. پیشنهادات
- ۱۰۷ ..... ۲-۴-۳۳. ارزیابی مدل های رگرسیون غیرخطی برای کمی کردن سرعت جوانه زنی سرخارگل
- ۱۰۷ ..... ۱-۲-۴-۳۴. اثرات دما و پتانسیل آب بر درصد جوانه زنی
- ۱۰۹ ..... ۲-۲-۴-۳۵. اثرات دما و پتانسیل آب بر سرعت جوانه زنی
- ۱۰۹ ..... ۳-۲-۴-۳۶. اثرات دما و پتانسیل آب بر یکنواختی جوانه زنی
- ۱۱۱ ..... ۴-۲-۴-۳۷. مقایسه مدل های مختلف رگرسیونی جوانه زنی به دما در پتانسیل های مختلف آب
- ۱۱۶ ..... ۵-۲-۴-۳۸. تعیین دماهای کاردینال (پایه، مطلوب و سقف)
- ۱۱۸ ..... ۲-۴-۳۹. نتیجه گیری و پیشنهادات
- ۱۱۹ ..... ۳-۴-۴۰. اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در استویا و سرخارگل مزرعه ای
- ۱۱۹ ..... ۱-۳-۴-۴۱. نتایج و بحث آزمایشات مزرعه ای سرخارگل
- ۱۱۹ ..... ۱-۳-۴-۴۲. فعالیت NADPH اکسیداز
- ۱۲۰ ..... ۲-۳-۴-۴۳. پراکسید هیدروژن



- ۱۲۰..... ۳-۱-۳-۴ پراکسیداسیون لیپید
- ۱۲۱..... ۴-۱-۳-۴ فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز
- ۱۲۲..... ۵-۱-۳-۴ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز
- ۱۲۳..... ۶-۱-۳-۴ روند تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز
- ۱۲۴..... ۷-۱-۳-۴ فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز
- ۱۲۶..... ۸-۱-۳-۴ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
- ۱۲۷..... ۹-۱-۳-۴ روند تغییرات فعالیت آنزیم‌های گلوکاتیون ردوکتاز و گلوکاتیون S- ترانسفراز
- ۱۲۸..... ۱۰-۱-۳-۴ روند تغییرات آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز
- ۱۲۹..... ۱۱-۱-۳-۴ فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز
- ۱۳۰..... ۱۲-۱-۳-۴ روند تغییرات فنل کل
- ۱۳۱..... ۱۳-۱-۳-۴ روند تغییرات فلانوئید
- ۱۳۲..... ۱۴-۱-۳-۴ روند تغییرات آنتوسیانین در برگ و گلبرگ سرخارگل
- ۱۳۳..... ۱۵-۱-۳-۴ روند تغییرات اسید آسکوربیک
- ۱۳۵..... ۱۶-۱-۳-۴ کلروفیل a
- ۱۳۶..... ۱۷-۱-۳-۴ کلروفیل b
- ۱۳۷..... ۱۸-۱-۳-۴ کلروفیل کل
- ۱۳۷..... ۱۹-۱-۳-۴ کارتنوئید
- ۱۳۸..... ۲۰-۱-۳-۴ روند تغییرات پروتئین محلول
- ۱۳۹..... ۲۱-۱-۳-۴ قند کل
- ۱۴۰..... ۲۲-۱-۳-۴ قند احیایی
- ۱۴۱..... ۲۳-۱-۳-۴ قند غیر احیایی
- ۱۴۱..... ۲۴-۱-۳-۴ نشاسته
- ۱۴۳..... ۲۵-۱-۳-۴ محتوی رطوبت نسبی آب برگ
- ۱۴۳..... ۲۶-۱-۳-۴ هدایت روزنه‌ای سطح رویی برگ
- ۱۴۴..... ۲۷-۱-۳-۴ وزن خشک برگ
- ۱۴۵..... ۲۸-۱-۳-۴ وزن خشک ریشه
- ۱۴۵..... ۲۹-۱-۳-۴ ارتفاع بوته
- ۱۴۶..... ۳۰-۱-۳-۴ وزن خشک ساقه

۱۴۷	..... تعداد شاخه فرعی ۳۱-۱-۳-۴
۱۴۷	..... تعداد غنچه ۳۲-۱-۳-۴
۱۴۸	..... تعداد گل ۳۳-۱-۳-۴
۱۴۹	..... عملکرد (وزن خشک گل) ۳۴-۱-۳-۴
۱۵۰	..... نتیجه گیری کلی ۱-۳-۴
۱۵۱	..... پیشنهادات ۱-۳-۴
۱۵۲	..... <b>۲-۳-۴ نتایج و بحث آزمایشات مزرعه‌ای استویا</b>
۱۵۲	..... پراکسید هیدروژن ۱-۲-۳-۴
۱۵۳	..... هدایت الکتریکی ۲-۲-۳-۴
۱۵۴	..... روند تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز ۳-۲-۳-۴
۱۵۵	..... فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ۴-۲-۳-۴
۱۵۶	..... روند تغییرات فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز ۵-۲-۳-۴
۱۵۷	..... فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز ۶-۲-۳-۴
۱۵۸	..... روند تغییرات فنل کل ۷-۲-۳-۴
۱۵۸	..... روند تغییرات فلانوئید ۸-۲-۳-۴
۱۶۰	..... روند تغییرات پروتئین محلول ۹-۲-۳-۴
۱۶۱	..... کلروفیل a ۱۰-۲-۳-۴
۱۶۱	..... کلروفیل b و کارتنوئید ۱۱-۲-۳-۴
۱۶۳	..... قند کل ۱۲-۲-۳-۴
۱۶۴	..... استویوزید ۱۳-۲-۳-۴
۱۶۵	..... میزان ریبودیوزاید A و استویول ۱۴-۲-۳-۴
۱۶۶	..... ارتفاع ساقه ۱۵-۲-۳-۴
۱۶۷	..... شاخه فرعی ۱۶-۲-۳-۴
۱۶۷	..... وزن خشک ساقه ۱۷-۲-۳-۴
۱۶۸	..... وزن خشک برگ ۱۸-۲-۳-۴
۱۶۹	..... نتیجه گیری کلی ۲-۳-۴
۱۷۰	..... پیشنهادات ۲-۳-۴
۱۷۱	..... فهرست

## فهرست اشکال

- ۳۱-۲-۱ شکل ارتباط بین سرعت جوانه‌زنی و دما ..... ۳۱
- ۴۸-۱-۳ شکل نمودار استاندارد پروتئین محلول ..... ۴۸
- ۵۰-۲-۳ شکل نمودار استاندارد پروتئین کل به روش مارک ول ..... ۵۰
- ۶۶-۱-۳ شکل منحنی استاندارد فنل کل ..... ۶۶
- ۶۸-۲-۳ شکل منحنی استاندارد اسید آسکوربیک ..... ۶۸
- ۷۰-۳-۳ شکل منحنی استاندارد قند کل ..... ۷۰
- ۷۲-۴-۳ شکل نمودار استاندارد قندهای احیایی ..... ۷۲
- ۷۴-۵-۳ شکل نمودار استاندارد قندهای غیراحیایی ..... ۷۴
- ۸۰-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر درصد جوانه‌زنی (A) ..... ۸۰
- ۸۰-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر سرعت جوانه‌زنی ( $\text{hour}^{-1}$ ) (B) بذر سرخارگل ..... ۸۰
- ۸۲-۲-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر کارایی استفاده از ذخایر بذر (A) ..... ۸۲
- ۸۲-۲-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر وزن خشک گیاهچه (B) سرخارگل ..... ۸۲
- ۸۳-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (A) ..... ۸۳
- ۸۳-۳-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر قند کل (B) ..... ۸۳
- ۸۴-۴-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر میزان قندهای احیایی (A) ..... ۸۴
- ۸۴-۴-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر قندهای غیر احیایی (B) سرخارگل ..... ۸۴
- ۸۵-۵-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر نسبت قندهای غیر احیایی به احیایی ..... ۸۵
- ۸۶-۶-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم پروتئاز ..... ۸۶
- ۸۷-۷-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر میزان پروتئین محلول (A) ..... ۸۷
- ۸۷-۷-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر پروتئین کل (B) ..... ۸۷
- ۸۸-۸-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز ..... ۸۸
- ۸۹-۹-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز ..... ۸۹
- ۹۰-۱۰-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم آرژینیناز ..... ۹۰
- ۹۱-۱۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر غلظت پراکسید هیدروژن (نانومول) (A) ..... ۹۱
- ۹۱-۱۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر هدایت الکتریکی (B) (میکروزیمنس بر متر بر گرم) ..... ۹۱
- ۹۲-۱۲-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (A) ..... ۹۲
- ۹۲-۱۲-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم کاتالاز (B) ..... ۹۲

- ۹۳-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز. (A) ..... ۹۳
- ۹۳-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (B) ..... ۹۳
- ۹۴-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز. .... ۹۴
- ۹۵-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر غلظت کلروفیل (A) a ..... ۹۵
- ۹۵-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر غلظت کلروفیل (B) b. .... ۹۵
- ۹۶-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون بر درصد جوانه زنی سرخارگل ..... ۹۶
- ۹۷-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر R50 بذر سرخارگل ..... ۹۷
- ۹۸-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر طول گیاهچه بذر سرخارگل ..... ۹۸
- ۹۹-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر طول ریشه چه ..... ۹۹
- ۱۰۰-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر وزن خشک گیاهچه ..... ۱۰۰
- ۱۰۱-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر کسر ذخایر پویا شده بذر ..... ۱۰۱
- ۱۰۱-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر کارایی استفاده از ذخایر بذر ..... ۱۰۱
- ۱۰۲-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر میزان استفاده از ذخایر بذر ..... ۱۰۲
- ۱۰۳-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر قدرت بذر سرخارگل ..... ۱۰۳
- ۱۰۳-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر درصد جوانه زنی بذر استویا ..... ۱۰۳
- ۱۰۴-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر سرعت جوانه زنی = (A) ..... ۱۰۴
- ۱۰۴-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر یکنواختی جوانه زنی بذر استویا (B) . ..... ۱۰۴
- ۱۰۵-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر قند کل (A) ..... ۱۰۵
- ۱۰۵-۱-۴ شکل اثر امواج فراصوتی بر پروتئین محلول بذر استویا (B) ..... ۱۰۵
- ۱۰۹-۲-۴ شکل تأثیر دما بر درصد جوانه زنی در پتانسیل های مختلف آب ..... ۱۰۹
- ۱۱۰-۲-۴ شکل درصد جوانه زنی تجمعی در دامنه ای از پتانسیل های آب و دماهای ..... ۱۱۰
- ۱۱۴-۲-۴ شکل رابطه سرعت جوانه زنی با دما با استفاده از مدل دو تکه ای (S) ..... ۱۱۴
- ۱۱۴-۲-۴ شکل رابطه سرعت جوانه زنی با دما با استفاده از مدل دندان مانند (D) ..... ۱۱۴
- ۱۱۵-۲-۴ شکل زمان تا جوانه زنی پیش بینی شده با استفاده از تابع دوتکه ای ..... ۱۱۵
- ۱۱۶-۲-۴ شکل زمان جوانه زنی پیش بینی شده با استفاده از تابع دندان مانند ..... ۱۱۶
- ۱۱۶-۲-۴ شکل جوانه زنی پیش بینی شده با استفاده از توابع دندان مانند (D) و دوتکه ای (S) ..... ۱۱۶
- ۱۲۰-۱-۳-۴ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت NADPH اکسیداز ..... ۱۲۰
- ۱۲۰-۱-۳-۴ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر پراکسید هیدروژن ..... ۱۲۰

- ۱۲۱-۳-۴-۳ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر پراکسیداسیون لیپید .....
- ۱۲۲-۳-۴-۴ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت SOD .....
- ۱۲۳-۳-۴-۵ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت کاتالاز.....
- ۱۲۴-۳-۴-۶ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت گایاکول پراکسیداز .....
- ۱۲۴-۳-۴-۷ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت گایاکول پراکسیداز گلبرگ ..
- ۱۲۵-۳-۴-۸ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت پلی فنل اکسیداز برگ .....
- ۱۲۵-۳-۴-۹ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت پلی فنل اکسیداز گلبرگ .....
- ۱۲۶-۳-۴-۱۰ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت آسکورات پراکسیداز .....
- ۱۲۸-۳-۴-۱۱ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز .....
- ۱۲۸-۳-۴-۱۲ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت گلوکاتایون s- ترانسفراز .....
- ۱۲۹-۳-۴-۱۳ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر گلوکاتایون پراکسیداز در برگ .....
- ۱۳۰-۳-۴-۱۴ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز .....
- ۱۳۱-۳-۴-۱۵ اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فنل کل گلبرگ .....
- ۱۳۲-۳-۴-۱۶ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت فلانوئید گلبرگ .....
- ۱۳۳-۳-۴-۱۷ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان آنتوسیانین گلبرگ .....
- ۱۳۳-۳-۴-۱۸ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت آنتوسیانین برگ .....
- ۱۳۴-۳-۴-۱۹ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت اسید آسکوربیک گلبرگ .....
- ۱۳۵-۳-۴-۲۰ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت آسکوربیک اسید .....
- ۱۳۶-۳-۴-۲۱ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت کلروفیل a .....
- ۱۳۶-۳-۴-۲۲ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت کلروفیل b .....
- ۱۳۷-۳-۴-۲۳ مقایسه‌ی میانگین اثر جاسمونیک و سالیسیلیک بر کلروفیل کل .....
- ۱۳۸-۳-۴-۲۴ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر کارتنوئید ..
- ۱۳۹-۳-۴-۲۵ اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان پروتئین محلول گلبرگ ..
- ۱۴۰-۳-۴-۲۶ اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر قند محلول .....
- ۱۴۰-۳-۴-۲۷ اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر قندهای احیایی .....
- ۱۴۱-۳-۴-۲۸ اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر قندهای غیر احیایی .....
- ۱۴۲-۳-۴-۲۹ اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر نشاسته .....
- ۱۴۳-۳-۴-۳۰ اثر محتوی رطوبت نسبی آب برگ .....

- ۱۴۳..... اثر هدایت روزه‌ای سطح رویی برگ ۳۱-۱-۳-۴
- ۱۴۵..... اثر جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر وزن خشک برگ ۳۲-۱-۳-۴
- ۱۴۵..... اثر جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر وزن خشک ریشه ۳۳-۱-۳-۴
- ۱۴۶..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر ارتفاع سرخارگل ۳۴-۱-۳-۴
- ۱۴۶..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر وزن خشک ساقه سرخارگل، ۳۵-۱-۳-۴
- ۱۴۷..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر تعداد شاخه فرعی سرخارگل ۳۶-۱-۳-۴
- ۱۴۷..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر تعداد غنچه سرخارگل ۳۷-۱-۳-۴
- ۱۴۹..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر تعداد گل ۳۸-۱-۳-۴
- ۱۵۰..... اثر جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر وزن خشک گل ۳۹-۱-۳-۴

#### ۲-۴- اشکال استویا

- ۱۵۳..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان پراکسید هیدروژن ۱-۲-۳-۴
- ۱۵۴..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان هدایت الکتریکی ۲-۳-۴
- ۱۵۵..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم گایاکول اکسیداز ۳-۲-۳-۴
- ۱۵۶..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ۴-۲-۳-۴
- ۱۵۷..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون s- ترانسفراز ۵-۲-۳-۴
- ۱۵۷..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز ۶-۲-۳-۴
- ۱۵۸..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان فنل کل ۷-۲-۳-۴
- ۱۵۹..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان فلانویید ۸-۲-۳-۴
- ۱۶۱..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر غلظت پروتئین محلول ۹-۲-۳-۴
- ۱۶۱..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر غلظت chla ۱۰-۲-۳-۴
- ۱۶۲..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر غلظت chlb ۱۱-۲-۳-۴
- ۱۶۲..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان کارتنوئید ۱۲-۲-۳-۴
- ۱۶۴..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان قند کل ۱۳-۲-۳-۴
- ۱۶۴..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان استویوزاید ۱۴-۲-۳-۴
- ۱۶۵..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان ریبودیوزاید ۱۵-۲-۳-۴
- ۱۶۵..... اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر میزان استویول ۱۶-۲-۳-۴
- ۱۶۶..... اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان ارتفاع ۱۷-۲-۳-۴

۱۶۷..... ۱۸-۲-۳-۴- اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر تعداد شاخه فرعی

۱۶۸..... ۱۹-۲-۳-۴- اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر وزن خشک ساقه

۱۶۹..... ۲۰-۲-۳-۴- اثر جاسمونیک و سالیسیلیک اسید بر وزن خشک برگ

## فهرست جداول پیوست

- جدول ۳-۱-۱ طرز تهیه استاندارد پروتئین محلول ..... ۴۷
- جدول ۳-۱-۲ طرز تهیه استاندارد پروتئین کل ..... ۴۹
- جدول ۳-۳-۱ طرز تهیه استاندارد فنل کل ..... ۶۶
- جدول ۳-۳-۲ طرز تهیه استاندارد اسید آسکوربیک ..... ۶۸
- جدول ۳-۳-۳ طرز تهیه استاندارد قند کل ..... ۷۰
- جدول ۳-۳-۴ طرز تهیه استاندارد قندهای احیایی ..... ۷۲
- جدول ۳-۳-۵ طرز تهیه استاندارد قندهای غیراحیایی ..... ۷۳
- جدول ۴-۲-۱ نتایج تجزیه واریانس درصد و یکنواختی جوانه‌زنی ..... ۱۰۷
- جدول ۴-۲-۲ جذر میانگین مربعات اشتباه ، ضریب تغییرات، ضریب تبیین ..... ۱۱۳
- جدول ۴-۲-۳ برآورد دمای پایه (T<sub>b</sub>)، دمای مطلوب (T<sub>o</sub>)، مطلوب تحتانی ..... ۱۱۷
- جدول ۴-۱-۱- پیوست تجزیه واریانس صفات درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی ..... ۱۸۸
- جدول ۴-۱-۲- پیوست تجزیه واریانس صفات نسبت قندهای غیراحیایی به احیایی ..... ۱۸۹
- جدول ۴-۱-۳- پیوست تجزیه واریانس صفات آلفاآمیلاز، پروتئاز، قند کل، آرژیناز ..... ۱۹۰
- جدول ۴-۱-۴- پیوست تجزیه واریانس صفات R50، Gmax ، طول گیاهچه و ریشه‌چه ..... ۱۹۱
- جدول ۴-۱-۵- پیوست تجزیه واریانس صفات وزن لپه‌های باقیمانده ..... ۱۹۱
- جدول ۴-۱-۶- پیوست تجزیه واریانس درصد حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی ..... ۱۹۳
- جدول ۴-۳-۱- تجزیه واریانس NADPH اکسیداز، پراکسید هیدروژن پراکسیداسیون لیپید ..... ۱۹۴
- جدول ۴-۳-۲- تجزیه واریانس گایاکول پراکسیداز برگ و گلبرگ، پلی‌فنل اکسیداز برگ و گلبرگ ..... ۱۹۵
- جدول ۴-۳-۳- تجزیه واریانس PAL، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین برگ و گلبرگ ..... ۱۹۶
- جدول ۴-۳-۴- تجزیه واریانس پروتئین برگ، chl a, b، کلروفیل کل، قند کل ..... ۱۹۷
- جدول ۴-۳-۵- تجزیه واریانس محتوی نسبی آب برگ و هدایت روزنه‌ای برگ در سرخارگل ..... ۱۹۸
- جدول ۴-۳-۶- تجزیه واریانس ارتفاع، شاخه‌فرعی، وزن خشک برگ، ریشه، ساقه، گل ..... ۱۹۹
- جدول ۴-۲-۳-۱- تجزیه واریانس پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)، EC، گایاکول پراکسیداز ..... ۲۰۰
- جدول ۴-۲-۳-۲- تجزیه واریانس فنل کل، فلاونوئید، پروتئین محلول، کلروفیل a و b ..... ۲۰۱
- جدول ۴-۳-۳-۳- تجزیه واریانس کلروفیل کل، قند کل، ارتفاع، شاخه فرعی استویا ..... ۲۰۲
- جدول ۵- همبستگی صفات فیزیولوژیکی سرخارگل ..... ۲۰۳
- جدول ۶- همبستگی صفات فیزیولوژیکی با وزن خشک برگ و ساقه استویا ..... ۲۰۴



# مقدمه و کلیات

## ۱-۱ پیش تیمار امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی

بذر عامل تکثیر و بروز ویژگی‌های زراعی یک ژنوتیپ و مهم‌ترین نهاده‌ی تولید محصولات زراعی و دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد است (۱۳۱). رویش بذر بسیاری از گیاهان توسط مکانیسمی که اصطلاحاً خواب نامیده می‌شود، ممانعت می‌گردد. خواب بذر پدیده‌ای طبیعی است که در بسیاری از گونه‌ها برای به حداکثر رساندن جوانه‌زنی دانه‌ها در زمان مناسب رخ می‌دهد. در واقع خواب تضمین‌کننده‌ی رویش بذر در شرایط مساعد می‌باشد. انواع کمون یا خواب بذر به پنج دسته تقسیم می‌شوند که شامل ۱- کمون از نظر فیزیولوژی ۲- کمون مورفولوژیکی ۳- کمون مورفوفیزیولوژیکی ۴- کمون فیزیکی ۵- کمون چند گانه که می‌تواند ترکیبی از نوع ۱ و ۴ باشد (۵۶).

### ۱-۱-۱ اهمیت جوانه‌زنی

جوانه‌زنی بذر یکی از حساس‌ترین مراحل زندگی گیاه است که با جذب آب توسط بذر شروع و با طویل شدن محور جنین از پوشش بذر به اتمام می‌رسد (۵۶). جوانه‌زنی سریع، یکنواخت و کامل بذرها باعث سبز شدن مطلوب و رشد اولیه‌ی سریع گیاه می‌شود. رشد اولیه‌ی مطلوب سبب دریافت بیشتر تشعشع خورشیدی و افزایش عملکرد می‌گردد (۷۰).

### ۱-۱-۲ گیاهشناسی سرخارگل

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* L. متعلق به خانواده *Astraceae*، گیاهی علفی، برگ‌ها متناوب، به رنگ سبز تیره، فاقد کرک و دندانه می‌باشد. سرخارگل دارای ساقه‌ای محکم می‌باشد که ارتفاع آن به یک تا یک و نیم متر می‌رسد. گل‌آذین کاپیتول، گل‌های زبانه‌های صورتی رنگ، گل‌های لوله‌ای قهوه‌ای و میوه فندقه چهار سطحی می‌باشد. موطن اصلی این گیاه شمال آمریکا بوده و در شمال رودخانه میسوری و کانادا به صورت انبوه می‌روید (۱، ۶، ۸۱). وزن هزار دانه‌ی آن ۴ گرم و میزان بذر

مورد نیاز جهت کاشت در یک هکتار زمین حدود ۱ کیلوگرم می‌باشد. سرخارگل یک گیاه با نیاز متوسط به طول روز می‌باشد، القای گلدهی در روزهای کوتاه به دنبال روزهای بلند اتفاق می‌افتد، حداقل ۴ هفته روزهای کوتاه به دنبال ۱۲ هفته روزهای بلند برای گلدهی نیاز می‌باشد (۱۳۷).

### ۱-۱-۳ بذرهای سرخارگل و جوانه‌زنی

جوانه‌زنی بذور سرخارگل ضعیف و نامنظم می‌باشد (۱۸۷ و ۱۸۸)، که ناشی از کمون یا خواب بذور می‌باشد (۲۶). یکی از مشکلات در کشت و تجاری‌سازی سرخارگل جوانه‌زنی نامناسب، ضعیف و تراکم نامناسب گیاهچه‌های سرخارگل می‌باشد. جوانه‌زنی ضعیف و تراکم پایین سبب افزایش مصرف بذر، کاهش توان رقابتی گیاهچه‌ها با علف‌های هرز می‌شود. کشت مستقیم بذر سرخارگل موجب جوانه‌زنی پایین و غیرقابل قبولی می‌گردد. در یک آزمایش مزرعه‌ای سرخارگل، جوانه‌زنی کمتر از ۱۰ درصد بذور سرخارگل گزارش شده است (۱۹۷).

### ۱-۱-۴ استراتیفیکاسیون و جوانه‌زنی

پیش‌تیمار کردن بذرها در شرایط سرد و مرطوب یعنی در شرایطی که آب جذب کرده‌اند و در دمای پایین نگهداری شوند، به خوبی سبب بهبود جوانه‌زنی می‌شود. این فرآیند استراتیفیکاسیون یا پیش‌سرما نامیده می‌شود. شایان ذکر است که برخی از بذور برای شکستن خواب‌شان نیاز به استراتیفیکاسیون دارند (۲۶).

### ۱-۱-۵ تناوب دمایی و جوانه‌زنی

بذر برخی از گیاهان برای جوانه‌زنی مطلوب نیازمند نوسان دمایی روزانه می‌باشند. به نظر می‌رسد که نیاز به نوسان دما در طی جوانه‌زنی با کمون بذر در ارتباط باشد. دماهای متناوب موجب تغییر ساختمان درشت اجزای بذر می‌شود که این مولکول‌ها در حالت اولیه و در شکل اصلی خود مانع جوانه‌زنی می‌شوند

(۴ و ۲۶). شاید محتمل‌ترین توضیح آن باشد که دماهای متناوب موجب تغییر موازنه مواد بازدارنده - تحریک‌کننده می‌شود که در چنین شرایطی چرخه دمای پایین موجب کاهش بازدارنده‌ها می‌شود و دمای بالا موجب افزایش تحریک‌کننده‌ها می‌شود که سرانجام به جوانه‌زنی منجر می‌گردد (۲۶).

### ۱-۱-۶ امواج فراصوتی (پرایمینگ فیزیکی) و جوانه‌زنی

پرایمینگ بذر شامل روش‌های بسیار ساده‌ای است که می‌تواند در جوانه‌زنی بهتر و استقرار مطلوب گیاهچه مؤثر باشد. یکی از روش‌های بیوفیزیکی پرایمینگ بذر، پیش‌تیمار بذرها با امواج آلتراسونیک یا فراصوتی می‌باشد (۲۱۸). محققان متعددی (۲۱۸، ۱۴۸ و ۱۳۵) استفاده از روش‌های فیزیکی را راهی برای افزایش تولیدات کشاورزی و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی بیان داشتند. امواج فراصوتی، امواج مکانیکی هستند که فرکانس آن‌ها بیش از ۲۰ KHZ، دارای انرژی بالایی بوده و می‌توانند سبب بالا رفتن دمای بافت‌ها شوند (۱۳۵). استفاده از امواج فراصوتی، میدان الکترومغناطیسی، لیزر و اشعه جهت تیمار بذرها پیشنهاد شده است (۱۹۶)، تیمار بذرها با این روش‌ها به آن‌ها اجازه رشد و توسعه‌ی اولیه‌ی سریع‌تری را می‌دهد. اعمال تیمار با امواج فراصوتی در شدت‌ها و بازه‌های زمانی به کار رفته در مطالعه بر روی گیاه جو سبب تحریک و افزایش جوانه‌زنی و عملکرد بذرهای جو گردید (۷۹). پیش‌تیمار بذرها با امواج فراصوتی سبب تسریع ۲ تا ۳ روزه جوانه‌زنی بذرهای پیش‌تیمار شده نسبت به شاهد گردید. گزارش شده است که دلیل افزایش ظرفیت جوانه‌زنی بذرها به شتاب و سرعت مراحل فیزیولوژیک و مورفولوژیک در بذرها به ویژه افزایش سرعت جذب آب می‌باشد (۷۹).

### ۱-۱-۷ فرآیندهای بیوشیمیایی جوانه‌زنی و امواج فراصوتی

از جمله آمیلاز جهت شکستن نشاسته، پروتئاز برای تجزیه پروتئین و لیپاز جهت شکستن لیپیدها را می‌دهد. ترکیب عمل این آنزیم‌های هیدرولیتیکی موجب فراهم شدن قندهای اصلی، آمینواسیدها و اسیدهای چرب شده و انتقال آن‌ها به محور جنینی را به دنبال دارد. نشاسته و قندهای محلول از

مهم‌ترین ترکیبات کربوهیدراتی در بذر می‌باشند (۲۶). جوانه‌زنی بذرهای سرخارگل بسیار پایین می‌باشد لذا با توجه به اهمیت بذر به عنوان یک نهاده‌ی مهم کشاورزی و نقش کلیدی بذرها در داشتن تراکم مناسب موارد زیر به عنوان اهداف پژوهش مد نظر قرار گرفت:

### ۱-۱-۸ اهداف پژوهش

- ۱- بررسی اثر پیش‌ تیمار بذر با امواج فراصوتی بر خصوصیات جوانه‌زنی، میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا‌ آمیلاز، پروتئاز، الکل دهیدروژناز، گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز، آرژیناز و نیز قندها، کلروفیل، پراکسید هیدروژن و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مرحله‌ی جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای سرخارگل.
- ۲- مطالعه تأثیر پیش‌ تیمار بذر سرخارگل در پنج مدت با امواج فراصوتی و سپس جوانه‌زنی در دمای  $25^{\circ}\text{C}$ ، پیش‌ تیمار بذر سرخارگل در پنج مدت با امواج فراصوتی و سپس جوانه‌زنی در دمای متناوب و نیز سه مدت پیش‌ تیمار سرمادهی و سپس جوانه‌زنی در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  بر خصوصیات جوانه‌زنی و رشد هتروتروفیک بذر سرخارگل.
- ۳- بررسی اثر امواج فراصوتی بر درصد، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی بذر استویا و اندازه‌گیری برخی خصوصیات بیوشیمیایی جوانه‌زنی بذر استویا در هنگام جوانه‌زنی.

## ۱-۲ ارزیابی مدل‌های رگرسیون غیرخطی برای کمی کردن سرعت جوانه‌زنی

### سرخارگل

بذر به عنوان اندام تکثیر جنسی گیاهان نقش مهمی در تولید گیاهان زراعی دارد و استقرار مناسب گیاه زراعی که شامل جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه می‌باشد، عامل کلیدی در دستیابی به حداکثر عملکرد می‌باشد.

### ۱-۲-۱ جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه

جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه از مراحل بحرانی و مهم در چرخه زندگی گیاه است. اثرات شرایط نامطلوب محیطی در طول این دوره و مراحل اولیه رشد گیاه نسبت به سایر مراحل رشد مهم‌تر به نظر می‌رسد. بنابراین، جوانه‌زنی خوب و مناسب در محدوده وسیعی از شرایط محیطی برای استقرار گیاهچه ضروری است. از مهم‌ترین عوامل محیطی مؤثر بر جوانه‌زنی دما و رطوبت می‌باشد. دستیابی به اطلاعاتی که بتواند دانش ما را در ارتباط با واکنش بذر به دما و پتانسیل آب افزایش دهد، در تصمیم‌گیری‌های دقیق‌تر زراعی اهمیت دارد.

### ۱-۲-۲ مزایای استفاده از مدل‌سازی

مدل‌سازی در مقایسه با سایر شاخه‌های علوم کشاورزی قدمت زیادی ندارد. کاهش آزمایش‌های درازمدت مزرعه‌ای در یک منطقه خاص و ارزیابی ریسک عملیات مدیریتی در عملکرد از جمله دلایل استفاده از مدل‌هاست. آزمایشات مدیریتی را می‌توان برای مدیریت در بیش از یک فصل به کار برد و اثرات درازمدت آن‌ها را در طول یک دهه یا بیشتر پیش‌بینی نمود (۱۲۳). به همین دلیل در سال‌های اخیر مطالعات در این زمینه افزایش یافته و رو به گسترش است. پیش‌بینی‌های مدل‌ها در راهنمایی طراحان و محققان قبل از آزمایش‌های مزرعه‌ای نقش مفیدی دارد. هرچند که سبزشدن در مزرعه

توسط اثرات متقابل محیطی پیچیده زیادی تعیین می‌شود، با این وجود، ثابت شده است که این مدل‌ها تا حد زیادی، قادر به ارائه تصویری روشن از سبزشدن در مزرعه هستند.

### ۱-۲-۳ دماهای کاردینال و اهمیت آن‌ها

جوانه‌زنی بذر هر گیاه در گستره‌ی دمایی خاصی صورت می‌گیرد که تحت عنوان دماهای کاردینال نامیده می‌شود (۶۰). در این گستره دماهای کمینه، بهینه و بیشینه قرار دارد که برای ارائه‌ی مدل‌های پیش‌بینی جوانه‌زنی لازم‌اند (۱۳۱). به طور کلی، برای اغلب گیاهان، سرعت نمو در دمای پایه در حد صفر است و با افزایش دما تا دمای بهینه افزایش می‌یابد ولی در دماهای بالاتر از آن کاهش شدیدی نشان می‌دهد (۱۳۱). گزارش‌های متعدد حاکی از اثر افزایشی دما تا نقطه‌ای خاص بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرها می‌باشند (۱۳۱). افزایش دما بعد از دمای بهینه علاوه بر کاهش سرعت جوانه‌زنی، می‌تواند زوال بذر را نیز به همراه داشته باشد (۱۱۶). اغلب مطالعات حاکی از آن است که به طور معمول با افزایش دما سرعت، حداقل در یک دامنه دمایی مناسب به طور خطی افزایش می‌یابد، ولی در دماهای بالاتر از آن افت شدیدی نشان می‌دهد (۱۳۱).

### ۱-۲-۴ کاربرد دماهای کاردینال

شناخت دماهای کاردینال و برهم کنش آن با میزان رطوبت خاک در تصمیم‌گیری دقیق زمان کاشت، اهمیت قابل توجهی دارد و با استفاده از آن می‌توان محدودیت‌های جغرافیایی برای کشت یک گونه یا ژنوتیپ و زمان مناسب برای کاشت را با توجه به رژیم دمایی و رطوبتی منطقه مورد نظر تعیین کرد. علاوه بر این با آگاهی از زمان سبز شدن علف‌های هرز، اتخاذ استراتژی مناسب در مدیریت علف‌های هرز و کنترل به موقع آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. مدل‌های مرتبط با سبز شدن اطلاعات مفیدی را در این زمینه مهیا می‌کنند. تعیین زمان دقیق سبز شدن علف‌های هرز نسبت به گیاه زراعی اغلب به سرعت و زمان سبز شدن وابسته می‌باشد که خود تحت تأثیر دمای خاک، پتانسل آب خاک و کمون قرار دارند.

### ۱-۲-۵ مدل‌های ریاضی و جوانه‌زنی

مدل‌های ریاضی متعددی برای توصیف الگوی جوانه‌زنی در واکنش به درجه حرارت ارائه شده‌اند (۱۹۹)؛ برخی از این مدل‌ها برای پیش‌بینی واکنش جوانه‌زنی تجمعی به کار می‌روند و قادر به پیش‌بینی دماهای کاردینال و ضرایب مدل برای مقایسه توده‌های بذری نیز می‌باشند (۱۳۱) انتخاب مدل مناسب برای کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی نسبت به دما، در تعیین دقیق دماهای کاردینال بسیار مهم می‌باشد.

توابع دمایی مختلفی برای توصیف واکنش جوانه‌زنی به دما وجود دارد که از میان آن‌ها سه تابع دوتکه‌ای، بتا و دندان مانند برای بررسی واکنش جوانه‌زنی بذرها به دما بیشتر از بقیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۷۰ و ۱۳۱). در مطالعه گیاه خشخاش با استفاده از مدل‌های رگرسیون غیرخطی مدل دوتکه‌ای به عنوان مدل برتر در پیش‌بینی سرعت جوانه‌زنی معرفی شد (۱۳۱). خلیلی (۲۰۱۳) نیز برای کمی کردن واکنش سرعت جوانه‌زنی گیاه جو به دما و پتانسیل آب از مدل‌های رگرسیون غیرخطی استفاده و مدل بتا را به عنوان مدل برتر معرفی کردند (۱۳)

## ۱-۲-۶ اهداف تحقیق

سرخارگل یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که مواد مؤثره آن سبب افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌گردد (۱۳۷). فرآورده‌های این گیاه دارویی جزو چهارمین گیاه دارویی پرفروش در اروپا و ششمین گیاه دارویی پرفروش در ایالات متحده در سال ۲۰۱۰ شناخته شده است (۶۵). با توجه به اینکه در سال‌های اخیر مصرف گیاهان دارویی در دنیا افزایش یافته است، سطح زیر کشت این گیاهان رو به افزایش است، مطالعات زراعی کمی درباره‌ی جوانه‌زنی گیاه سرخارگل صورت گرفته است با توجه به اینکه اطلاعات زیادی در ارتباط با واکنش جوانه‌زنی سرخارگل به دما، پتانسیل آب، پارامترهای جوانه‌زنی و سبز شدن آن وجود ندارد؛ لذا این تحقیق جهت پر کردن خلأ احساس شده صورت گرفته و در واقع هدف از انجام این پژوهش کمی‌سازی واکنش جوانه‌زنی و سبز شدن به دما و رطوبت می‌باشد.



## ۱-۳ اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در استویا و سرخارگل

### در شرایط مزرعه‌ای

گیاهان دارویی نقش مهمی در سلامت افراد جامعه ایفا می‌کنند. ارزش گیاهان دارویی به جهت ترکیبات شیمیایی آنها (ترپنوییدها، آلکالوئیدها، پلی فنول و تانن‌ها و ...) می‌باشد. طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی که شامل گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنهاست، با رشد قابل توجهی رو به افزایش بوده است. درمان با داروهایی با منبع گیاهی مؤثرتر و مقرون به صرفه است. علاوه بر این داروهای گیاهی عوارض جانبی پایینی دارند که اهمیت آنها را دوچندان می‌کند.

### ۱-۳-۱ گیاهشناسی سرخارگل

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* L. از خانواده *Astraceae*، بومی آمریکای شمالی می‌باشد (۸۱). نام گیاه از ریشه‌ی کلمه‌ی یونانی *Echinos*، به معنی جوجه تیغی گرفته شده است که اشاره به تیغ‌دار بودن و خارهای برجسته روی بذرهای گیاه دارد. این گیاه در فلور ایران وجود ندارد و کاشت آن برای اولین بار توسط کوره‌پز به صورت آزمایشی در سال ۱۳۸۰ انجام شد (۳۰).

### ۱-۳-۲ اهمیت سرخارگل

سرخارگل یکی از مهمترین گیاهان دارویی در صنایع داروسازی کشورهای توسعه یافته می‌باشد مواد مؤثره این گیاه سبب افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌گردد (۱۰). این گیاه بعنوان دارویی مؤثر در پیشگیری و درمان امراضی چون سرماخوردگی، آنفولانزا، التهابات پوستی و عفونت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸۱). از آنجا که این گیاه خاصیت تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی بدن و ضد ویروس را دارد، در درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی می‌توان از آن استفاده کرد (۱۰)؛ این گیاه امروزه به عنوان کاندیدای درمان بیماری ایدز مطرح است (۱۳۷).

### ۱-۳-۳ ترکیبات مهم سرخارگل

تمام پیکر این گیاه از ریشه و اندام هوایی، حاوی مواد ارزشمندی از قبیل ترکیبات آلکیل آمیدی، ایزوبوتیل آمید، پلی استیلن ها، پلی ساکاریدهای محلول در آب، مشتقات اسید کافئیک مثل اکیناکوزید، اسید شیکوریک و فلاونوئیدها است. همچنین دارای اسانس هم می باشد که مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس سرخارگل هومولن، کاریوفیلن و اکسید کاریوفیلن می باشند. پلی ساکاریدها محرک های ایمنی و ضد التهاب از جمله مهم ترین آنها اینولین به میزان ۵/۹٪ در ریشه وجود دارد و فلاونوئیدها به میزان ۰/۵-۰/۳ درصد در گیاه وجود دارد (۱، ۱۳۷ و ۸۱).

### ۱-۳-۴ اهمیت اقتصادی سرخارگل

فرآورده های دارویی سرخارگل جزو چهارمین گیاه دارویی پر فروش در اروپا و ششمین گیاه دارویی پر فروش در ایالات متحده در سال ۲۰۱۰ شناخته شده است (۶۵). حداکثر مقدار وزن خشک از پیکر رویشی گیاهان دو ساله حاصل می گردد، زیرا با افزایش سن گیاه مقدار بافت های چوبی گیاه افزایش می یابد. در مرحله گل دهی کامل پیکره رویشی از ارتفاع ۲۰ سانتی متری برداشت می گردد. سرخارگل تا سال چهارم دارای بازده اقتصادی می باشد. بهترین زمان جمع آوری ریشه گیاه پس از دوره گلدهی آن است (۳۰).

### ۱-۳-۵ ایسیتورها و متابولیت ثانویه

مهم ترین مشکل در تجاری سازی گیاهانی که متابولیت های ثانویه از آنها استخراج می شود میزان تولید در سطوح کم و تقاضای بالای صنعت برای این مولکول ها می باشد؛ سنتز شیمیایی این متابولیت ها معمولاً پیچیده و پرهزینه می باشد. به منظور افزایش تولید متابولیت های ثانویه از روش های مختلفی استفاده می شود که شامل استفاده از ایسیتورها، افزودن پیش سازها، بهینه سازی محیط کشت، کشت ریشه های موئن و مهندسی متابولیت می باشد (۷). استفاده از ایسیتورها یکی از مهم ترین روش ها برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه است. ایسیتورها مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که

می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین (phytoalexin) را در گیاه القا کنند (۷). استفاده از اسید سالیسیلیک (۷۸، ۱۷۷، ۱۷۸ و ۱۸۰) و جاسمونات‌ها (الیسیتور شیمیایی) به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القا که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود معرفی شده است (۷ و ۲۱۱). اسید سالیسیلیک هورمون گیاهی است که نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر جوانه‌زنی بذر، کنترل تنفس، بسته‌شدن روزنه‌ها، گلیکولیز، القای گلدهی و تولید گرما دارد (۷۸ و ۱۷۸). هورمون‌های گیاهی گروه جاسمونات (متیل جاسمونات، اسید جاسمونیک، توبرونیک اسید و نظایر آن) از طریق هیدروپراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع به وسیله‌ی آنزیم لیپواکسیژناز در اثر تنش اکسیداتیو تولید می‌شوند. کاربرد اسید جاسمونیک اگزوزن یا بیرونی می‌تواند تجمع متابولیت‌های ثانویه را در گیاه افزایش دهد. تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه عمدتاً در واکنش به تنش‌ها یا مولکول‌های محرک رخ می‌دهد. اسید جاسمونیک به عنوان ترکیبی شناخته می‌شود که نسخه‌برداری ژن‌های میزبان دخیل در متابولیسم گیاهی را فعال می‌کند (۲۸ و ۲۱۱). از بین ژن‌های مذکور و ژن‌های تحریک رشد، ژن‌هایی وجود دارند که آنزیم‌های کلیدی تمام مسیرهای مهم مرتبط با متابولیت ثانویه را رمز می‌کند (۲۸، ۱۱۰ و ۱۴۰).

### ۱-۳-۶ الیسیتور (القاکننده تنش کاذب در گیاه) و فعال شدن سیستم‌های

#### دفاعی

تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاه عمدتاً در واکنش به تنش‌ها یا مولکول‌های محرک رخ می‌دهد (۷). این مولکول‌های پیام‌رسان در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القاکننده آنزیم‌های خاص کاتالیز-کننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مثل پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند. وقتی این مولکول‌های پیام‌رسان (اسید سالیسیلیک و جاسمونیک) به صورت خارجی بکار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان یک سری از ژن‌های دفاعی می‌گردند (۲۰۳). قرار

گرفتن در معرض مولکول‌های پیام‌رسان موجی از انتقال پیام را تحریک می‌کند، مسیرهای پیچیده‌ی پیامی فعال می‌شوند، مؤلفه‌های اصلی در این مقوله، یک تغییر موقت در نفوذپذیری غشای پلاسمایی به یونهاست. فعال شدن ژن R سبب تحریک جریان رو به داخل یون‌های  $\text{Ca}^{+2}$  و  $\text{H}^{+}$  به سلول و جریان رو به خارج یون‌های  $\text{k}^{+}$  و  $\text{Cl}^{-}$  از سلول می‌شود (۷ و ۲۸). جریان رو به داخل  $\text{Ca}^{+2}$  سبب رخداد‌های اکسیداتیو ناگهانی می‌شود که سبب فعال شدن NADPH اکسیداز مسئول تولید گونه‌های فعال اکسیژن واکنش دهنده گشته و به دنبال آن، گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تولید می‌شود. ژن‌های دفاعی مانند فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL; phenylalanine ammonia-lyase)، گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST) و چالکون سنتاز (CHS; Chalcone synthase) فعال می‌شوند. مولکول‌های دفاعی مانند تانن و فیتو آلكسین‌ها تولید می‌شوند؛ سنتز متابولیت‌های ثانویه افزایش پیدا می‌کند و مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR; Systemic acquired resistance) ایجاد می‌شود.

### ۱-۳-۷ ترکیبات فنیل پروپانوییدی

از آنجا که یکی از مهمترین مواد مؤثره‌ی سرخارگل از خانواده‌ی فنیل پروپانوییدی می‌باشند (۱۰) و چون جهت استانداردسازی فرمولاسیون‌های گیاهان دارویی، یک ترکیب و یا دسته‌ی مشخصی از ترکیبات به عنوان مارکر ردیابی شده و تعیین مقدار می‌شوند، لذا در اکثر فرمولاسیون‌های گیاه سرخارگل طبق مراجع معتبر مجموع ترکیبات فنلی نظیر اسید کلروژنیک، اسید شیکوریک، اسید کافتاریک و غیره تعیین می‌گردند، به لحاظ اینکه این ترکیبات فنلی می‌باشند بنابراین می‌توان فنل کل را به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات مؤثره‌ی سرخارگل در نظر گرفت (۱۰). ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌شوند اما تنش‌ها و مولکول‌های محرک مقدار آنها را در سلول تغییر می‌دهد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی سینامیک استرها و لیگنین‌ها از ترکیبات فنلی و جزو متابولیت ثانویه حاصل از مسیر فنیل پروپانوییدی می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شوند.

## ۱- ۳-۸ هدف از پژوهش

۱- بررسی اثر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در القای تنش اکسیداتیو، افزایش مقاومت و

عملکرد در سرخارگل

۲- اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر برخی آنتی‌اکسیدان‌ها، قند محلول و پراکسیداسیون

لیپید در سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای

۳- اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان قندها، کلروفیل، عملکرد و اجزای عملکرد در

سرخارگل

۴- اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر آنزیم‌های محرک تنش اکسیداتیو، دفاعی و روند تغییرات

ترکیبات فنلی در سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای

۵- اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر برخی عوامل روزنه‌ای و محتوای رطوبت

نسبی برگ در سرخارگل

۶- معرفی سرخارگل به عنوان یک گیاه دارویی جدید برای کشت و پرورش در منطقه‌ی شاهرود.

*Stevia rebaudiana Bertoni* یکی از گیاهانی است که در دهه‌های اخیر به دلیل وجود ترکیبات شیرین‌کننده‌ای که در این گیاه وجود دارد، از نظر دارویی و اقتصادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گلیکوزیدهای استویا ۳۵۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز هستند (۱۱۱). با توجه به مشکلات روزافزون ناشی از دیابت، چاقی، سکت‌های قلبی و مغزی استویا می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند باشد.

### ۱-۳-۹ مبدأ، خاستگاه و گیاهشناسی استویا

این گیاه ابتدا توسط گیاهشناس و پزشک اسپانیایی Pedro Esteve Jaime یافته شد. استویا نامی است که این گیاهشناس و پزشک بر این گیاه نهاد. اولین توصیفات گیاهشناسی آن توسط برتونی در سال ۱۸۹۹ صورت گرفت و در سال ۱۹۰۵، *Rebaudianum Bert* نامیده شد، *Rebaudi* به افتخار اولین شیمی‌دانی که به مطالعه ویژگی‌های شیمیایی مواد استخراج شده استویا پرداخت به نام استویا اضافه گردید. (۴۷). *Stevia rebaudiana bertonii* گیاهی علفی، چند ساله از خانواده‌ی *Astraceae*، بومی پاراگوئه می‌باشد. استویا در ارتفاع ۵۰۰-۳۰۰ متری در نواحی کوهستانی نیمه خشک، همچنین در علفزارها، جنگل‌های با درختان کوتاه رشد می‌نماید (۴۷). ارتفاع این گیاه می‌تواند به یک متر یا بیشتر برسد. استویا گیاهی با سیستم ریشه‌ای گسترده، ساقه‌ای ترد، شکننده و چوبی می‌باشد. برگ‌هایش کوچک بیضوی بدون دم‌برگ و نیزه‌ای می‌باشد. آرایش برگ‌های استویا به صورت متناوب و LAI (شاخص سطح برگ)، ۸۰ روز پس از کاشت ۴/۸۳ می‌باشد (۴۷). گل‌های استویا مرکب، ارغوانی کم‌رنگ می‌باشد و به صورت خوشه‌ای در روی ساقه پدیدار می‌شوند. استویا گیاهی خودناسازگار می‌باشد و گرده‌افشانی در آن بوسیله‌ی حشرات صورت می‌گیرد. میوه‌اش ۵ بذر آچین یا فندقه می‌باشد (۴۷ و ۱۶۸).

### ۱-۳-۱۰ اهمیت استویا

امروزه استویا به دلیل ترکیبات شیرین کننده‌ای که در آن وجود دارد و چندین برابر شیرین تر از ساکارز می‌باشد شهرت جهانی یافته است و به برگ عسلی، برگ قندی، برگ شیرین و معجزه طبیعت معروف می‌باشد (۴۷). این ترکیبات طبیعی از شیرین کننده‌های طبیعی بدون کالری می‌باشند که قابلیت جایگزینی با شیرین کننده‌های سنتتیک مثل ساکارین و سیکلامات که برای مصرف کننده‌های رژیمی استفاده می‌شود را دارد. مهم‌ترین ترکیبات *S. rebaudiana*، استیویوزاید و ریبودیوزاید A می‌باشند. از آنجا که گلیکوزیدهای استیویول در بدن شکسته و جذب نمی‌شوند ارزش غذایی آنها پایین می‌باشد. محدودیت در جذب کربوهیدرات سبب می‌شود که حتی دیابتی‌ها و افراد چاق بدون نگرانی از افزایش قند و وزن از ترکیبات شیرین کننده با کالری اندک لذت ببرند. به همین دلیل در حال حاضر بیشترین استفاده از این ماده برای بیماران دیابتی می‌باشد، علاوه بر این استویا بعنوان شیرین کننده‌ی صنایع غذایی و داروسازی بسیار کاربرد دارد (۴۷ و ۱۶۸). این گیاه، خاصیت ضد سرطان، قند خون، و بیماری‌های قلبی و عروقی دارد که این اثرات مفید به سبب حضور ترکیبات فنلی در این گیاه است که خاصیت پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۳۳).

### ۱-۳-۱۱ نیازهای اکولوژیکی استویا

استویا گیاهی روز کوتاه می‌باشد، در نیمکره جنوبی از بهمن تا فروردین و در نیمکره شمالی از مهر تا دی گل می‌دهد. گلدهی تحت شرایط روز کوتاه از ۱۰۴-۵۴ روزگی بعد از نشا اتفاق می‌افتد که البته تحت تأثیر طول روز و حساسیت رقم نیز قرار دارد. حساسیت به طول روز در استویا زیاد، در دامنه‌ای از ۸-۱۴ ساعت متغیر می‌باشد. استویا بعنوان گیاهی یکساله در عرض جغرافیایی بالا و متوسط کشت می‌شود، روزهای بلند طول میان گره‌ها، سطح برگ، وزن خشک برگ، قندهای محلول، پروتئین و تجمع گلیکوزیدها را افزایش می‌دهد. استویا به سرما حساس بوده و دماهای زیر اسید  $9^{\circ}\text{C}$  را نمی‌تواند تحمل

کند. برای رشد مطلوب استویا دمای  $24^{\circ}\text{C}$  -  $20^{\circ}\text{C}$  لازم می‌باشد. از نظر نیاز آبی، استویا به میزان قابل توجهی آب نیاز دارد، استویا در نواحی با آب و هوای نیمه مرطوب و نیمه گرمسیری به ترتیب با دامنه بارندگی  $1500-1800$  میلی‌متر و دامنه دمایی  $10-43^{\circ}\text{C}$  رشد می‌یابد (۴۷، ۷۶ و ۱۶۸).

### ۱-۳-۱۲ ترکیبات استویا

شیرین‌کننده‌های طبیعی برگ استویا که استیویول گلیکوزید نامیده می‌شوند دی‌ترین هستند، همگی جدا شده و شامل استیویوزاید، Reb-A، Reb-B، Reb-C، Reb-D، Reb-E، Reb-F و دولکوزاید می‌باشند. کینگ‌ران (۱۹۸۷) بیان داشت که استیویوزاید، ریبودیوزاید A، ریبودیوزاید B، ریبودیوزاید C و دولکوزاید A به ترتیب ۲۱۰، ۲۴۲، ۳۰ و ۳۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز می‌باشند، همچنین کینگ‌ران استیویوزاید و ریبودیوزاید A را به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات استویا گزارش نمود و بیان داشت که استیویوزاید ۱۰٪-۵٪ وزن خشک برگ (۷۰٪-۶۰٪ از محتویات گلیکوزیدها) و ریبودیوزاید (Reb-A) ۴٪-۲٪ وزن خشک ترکیبات برگ (۴۰٪-۳۰٪ از کل شیرین‌کننده‌ها) را شامل می‌شود. ریبودیوزاید B و C ۱-۲٪ را شامل می‌شود (۱۳۷). استیویوزاید به جهت دارا بودن تلخی مزه گاهاً از اینکه به عنوان شیرین‌کننده محسوب شود مورد تردید می‌باشد. استیویوزاید در دامنه‌ی وسیعی از دما و pH با ثبات می‌باشند، مثلاً در  $100^{\circ}\text{C}$ ، مدت زمان ۱ ساعت و دامنه‌ی pH از ۳ تا ۹ دارای ثبات می‌باشد اما همین شرایط با pH بیشتر از ۹ فاقد ثبات می‌باشد (۴۷ و ۱۶۸). در میان ترکیبات استویا، ریبودیوزاید A ترکیبی ویژه، برجسته، مورد علاقه به جهت دارا بودن طعمی مطلوب و شیرین‌تر می‌باشد، به گونه‌ای که هدف در اصلاح نباتات تولید استویا هایی است که دارای مقادیر بالایی از Reb-A باشد (۴۷ و ۱۶۸).

### ۱-۳-۱۳ کشورهای تولیدکننده‌ی استویا

مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده‌ی استویا ژاپن، چین، تایوان، تایلند، کره، برزیل، مالزی و پاراگوئه می‌باشد. در حال حاضر استویا در ژاپن، برزیل، کره، ایالات متحده آمریکا، آرژانتین، چین، کانادا، پاراگوئه



و اندونزی مصرف می‌شود و تاکنون هیچگونه عوارض جانبی ناشی از استفاده از آن گزارش نشده است (۴۷ و ۱۶۸).

### ۱-۳-۱۴ فرضیات و اهداف

اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک طیف وسیعی از ژن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اسید جاسمونیک و متیل‌جاسمونات سبب افزایش ژن‌های دخیل در بیوسنتز انواع گلیکوزیدها در گیاهان می‌شود. در بسیاری از تحقیقات به نقش جاسمونات‌ها در افزایش گلیکوزیدهای گیاهان، لیگنین و لیگنان‌ها اذعان شده است (۸۸، ۱۰۶، ۹۱، ۱۶۳ و ۱۹۴). از آنجا که اغلب گلیکوزیدها در پاسخ به انواع گیاه‌خواران نقش دفاعی دارند احتمال می‌رود که در گیاه استویا نیز این ترکیبات نقش دفاعی داشته باشند، یک مطالعه قدیمی، تولید گلیکوزید در گیاه استویا را نوعی سازوکار دفاعی می‌داند (۱۸۳) و با این رویکرد که احتمالاً تحریک استیویا با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک می‌تواند محرک افزایش سنتز گلیکوزیدهای آن یا تغییر در نسبت آنها شود، همچنین این گیاه، خاصیت ضد سرطان، قند خون، و بیماری‌های قلبی و عروقی دارد که این اثرات مفید به سبب حضور ترکیبات فنلی در این گیاه است که خاصیت پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۴).

هدف از پژوهش:

- ۱- بررسی اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان قندها، کلروفیل، عملکرد و اجزای عملکرد در استویا
- ۲- بررسی اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در القای متابولیسم ترکیبات فنیل‌پروپانوییدی از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های PAL (آنزیم کلیدی این مسیر) و نیز اندازه‌گیری مقدار فنل کل در نظر گرفته شد.

۳- معرفی استویا به عنوان گیاه جدید در منطقه‌ی شاهرود

۴- اندازه‌گیری گلیکوزیدها در ۳ تیمار.



# فصل دوم: مروری بر

منابع

## ۲-۱ مروری بر منابع اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی

جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه از مراحل بحرانی و مهم در چرخه زندگی گیاهان است (۲۱۴). جوانه‌زنی بذر یک فرآیند بیولوژیکی پیچیده است که عوامل ژنتیکی و محیطی گوناگون بر روی آن تأثیر دارند (۲۹). خواب بذر به عنوان خصوصیت درونی و ذاتی بذر تعریف می‌شود که تعیین‌کننده قدرت جوانه‌زنی در شرایط محیطی بذر می‌باشد. جوانه‌زنی بذور سرخارگل ضعیف و نامنظم می‌باشد (۱۸۷ و ۱۸۸). اتواتر جوانه‌زنی پایین بذره‌های سرخارگل را به خواب یا کمون بذرها نسبت داد (۴۹). کمون بذر سرخارگل ترکیبی از دو نوع کمون فیزیولوژیکی (درب‌گیرنده کنترل‌هایی در درون خود جنین) به همراه کمون ناشی از پوشش‌های بذر (کمون فیزیکی) است. برای برطرف کردن خواب بذر روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که در این آزمایش استفاده امواج فراصوتی و سرمادهی استفاده شد.

## ۲-۱-۱ اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد

پیش‌تیمار بذر با امواج فراصوتی یکی از ایمن‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین تیمارهای قبل از کاشت بذر به منظور رشد مطلوب‌تر گیاهچه و استقرار محصول در مزرعه می‌باشد. گزارش شده است که امواج فراصوتی قدرت بذر، بذره‌های گیاهان مختلف را افزایش می‌دهد، اما شرایط بهینه اعمال تیمار با امواج فراصوتی در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (۷۹). در گیاه جو گزارش شده است که پیش‌تیمار با امواج فراصوتی در دمای  $30^{\circ}\text{C}$ ، ۴۶۰ وات و ۱۵ دقیقه حداکثر جوانه‌زنی را در پی داشت (۲۱۸). بهترین زمان پیش‌تیمار با امواج فراصوتی در نخود، گندم و هندوانه به ترتیب ۴۵، ۳۰ و ۵ دقیقه گزارش شد (۲۱۸). همچنین آن‌ها بیان داشتند وسعت دامنه‌ی شرایط مطلوب جوانه‌زنی احتمالاً با خصوصیات مختلف بذر مثل اندازه، ضخامت پوسته بذر و کمون در ارتباط است (۲۱۸). امواج فراصوتی باعث افزایش شاخص‌های رشد به ویژه طول ریشه در گیاهچه می‌شود. که این عمل می‌تواند در کسب رطوبت و مواد

غذایی از محیط نقش بسزایی داشته باشد. از طرف دیگر با افزایش فعالیت آنزیم‌های جوانه‌زنی و شاخص - های جوانه‌زنی امواج فراصوتی می‌تواند به عنوان محرک و نیروی اولیه جوانه‌زنی، افزایش بنیه و تسریع در جوانه‌زنی بذرهای گیاهان استفاده شود (۱۳۵ و ۱۹۵).

## ۲-۱-۲ جوانه‌زنی و ذخایر هتروتروفی

همزمان با استقرار گیاه در خاک، جذب آب و تولید بخش عمده غذای مورد نیاز توسط گیاهچه انجام شده و به تدریج گیاهچه از بافت ذخیره‌ای مستقل می‌گردد. پس از آن فرآیند جوانه‌زنی کامل می‌گردد (۱۹۸). در حقیقت رشد گیاه در مرحله هتروتروفی نتیجه فرآیندهای متعددی از جمله وزن منتقل شده از ذخایر بذر (میلی گرم در بذر) و کارایی تبدیل مواد منتقل شده از ذخایر بذر (میلی گرم در بذر)، و کارایی تبدیل مواد منتقل شده به بافت گیاهچه‌ای یا به عبارت دیگر تولید وزن خشک گیاهچه به ازای هر واحد ماده ذخیره‌ای بذر است. استقرار مطلوب بذر تحت تاثیر کیفیت بذر به ویژه قدرت یا بنیه بذر، قوه نامیه و ظرفیت جوانه‌زنی می‌باشد (۹۵ ۱۹۸).

## ۳-۱-۲ آنزیم آلفا آمیلاز، قندهای محلول و جوانه‌زنی

به مجرد جذب آب توسط بذر، تغییرات محسوسی در متابولیسم بذر رخ می‌دهد. فعالیت آنزیم‌ها (از جمله آمیلازها) طی مراحل یک و دو جذب آب شروع می‌شود. مراحل جوانه‌زنی به انرژی نیاز دارد. نشاسته و قندهای محلول از مهم‌ترین ترکیبات کربوهیدراتی در بذر می‌باشند (۲۶). در طول جوانه‌زنی، ابتدا نشاسته به قندهای آزاد و دکسترین تبدیل می‌شود. این قندها در لپه‌های بذرهای دولپه‌ای به ساکارز (قند غیراحیایی) تبدیل می‌شوند و در محور جنینی، ساکارز به وسیله آنزیم اینورتاز به گلوکز (قند احیایی) و فروکتوز تبدیل می‌شود و آن‌ها جهت تأمین انرژی یا پیش‌ماده‌های لازم در ساخت ترکیبات جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۶). در نتیجه با جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه از میزان نشاسته (کربوهیدرات متداول ذخیره‌ای در بذر) کاسته و به میزان قندهای کل، احیایی و غیراحیایی افزوده می‌شود (۲۶). گزارش شده است که پیش‌تیمار بذرهای جو با امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت

آنزیم آلفاآمیلاز و جوانه‌زنی بذر جو گردید (۲۱۸). آن‌ها دلیل افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و جوانه‌زنی جو را به افزایش نفوذپذیری پوسته جو نسبت به آب، تسهیل در نفوذپذیری و افزایش سرعت نفوذ آب و به دنبال آن آماس بذر نسبت دادند (۲۱۸). محققان متعددی (۱۹۶، ۱۵۱ و ۱۴۸) افزایش سیالیت دیواره سلولی در نتیجه حرکت عناصر غذایی موجود در آندوسپرم را یکی دیگر از دلایل افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز بیان داشتند.

## ۲ - ۱ - ۴ آنزیم الکل دهیدروژناز و جوانه‌زنی

در بذرهای در حال جوانه‌زنی فرض می‌شود بعد از آبنوشی و آماس بذر و قبل از پاره شدن پوشش بذر، Anoxia (کمبود اکسیژن) رخ می‌دهد، چون انتشار گاز در آب ده‌هزار مرتبه کاهش می‌یابد، آبنوشی بذر نفوذپذیری  $O_2$  را ضعیف می‌کند. در این شرایط تولید انرژی از طریق تخمیر اتفاق می‌افتد و از مسیر گلیکولیز برای تولید ATP استفاده می‌شود (۱۴ و ۵۴). زیرا اکسیژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون در انتقال میتوکندریایی مصرف می‌شود، بنابراین به علت کمبود اکسیژن، تنفس هوازی و سنتز ATP در میتوکندری متوقف می‌گردد (۵۴). یکی از مهمترین آنزیم‌های مسیر تنفس بی‌هوازی آنزیم الکل-دهیدروژناز می‌باشد، بالاترین میزان فعالیت این آنزیم بعد از آبنوشی یعنی زمانی است که به بذر اجازه‌ی جوانه‌زنی داده می‌شود و بعد از جوانه‌زنی فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. وقتی اکسیژن محدود می‌شود تنفس بی‌هوازی مسیر تخمیر گلیکولیز جایگزین تنفس هوازی می‌شود. پیرووات دکربوکسیلاز (PDC) واکنش تبدیل پیرووات به استالیدیید را کاتالیز می‌کند که اولین گام در مسیر تخمیر می‌باشد. سپس الکل دهیدروژناز (ADH) استالیدیید را به اتانول تبدیل می‌کند بنابراین  $NAD^+$  تولید می‌گردد که یک فرآیند بسیار مهم در مسیر تخمیر اتانول می‌باشد و یک فرآیند برای گلیکولیز پایدار تحت شرایط کمبود اکسیژن می‌باشد. پیرووات همچنین سوبسترای لاکتات دهیدروژناز را مجدداً تولید می‌کند که از تبدیل لاکتات  $NAD^+, LDH$  را تولید می‌کند. عملکرد نهایی تولید ATP در طول تخمیر تولید ۲ مولکول ATP از هر مولکول گلوکز در مقابل تولید ۳۸ مولکول ATP در طول تنفس میتوکندریایی می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که فعالیت بالاتر الکل دهیدروژناز (ADH) عاملی مهمی در تأمین سریع‌تر انرژی بعد از آبنوشی

بذر در شرایط کمبود اکسیژن جهت فعالیت سوخت و ساز فرآیند جوانه‌زنی می‌باشد (۷، ۵۴، ۲۰۵ و ۲۱۶).

## ۲-۱-۵ آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز و جوانه‌زنی

این آنزیم NADPH را برای واکنش‌های بیوسنتزی اکسیداسیون و احیا تأمین می‌کند. این آنزیم توسط NADPH مراحل احیاکننده مربوط به واکنش‌های بیوسنتزی مختلفی که در سیتوسول اتفاق می‌افتد را پیش می‌برد. در پلاستیدهای غیرسبز (مانند آمیلوپلاست‌ها) و در پلاست‌هایی که در تاریکی عمل می‌کنند، این مسیر NADPH لازم برای واکنش‌های بیوسنتزی لیپید و آسمیلاسیون نیتروژن را تأمین می‌کند (۹۷ و ۱۸۵). این آنزیم NADPH را برای تنفس تأمین می‌کند، چون میتوکندری‌های گیاهی قادرند از طریق NADPH دهیدروژناز واقع در سطح بیرونی غشای درونی، NADPH سیتوسولی را اکسید کنند، ممکن است مقداری از قدرت احیاکنندگی تولید شده توسط این مسیر در متابولیسم انرژی سلولی شرکت کند. علاوه بر این ریبولوز ۵- فسفات که پیش‌ماده برای ریبوز و دی‌اکسی بوده تولید می‌شود. و نیز در تولید مواد حد واسط چرخه کلونین نقش دارند. فعالیت این آنزیم توسط نسبت بالای NADPH به  $NADP^+$  ممانعت می‌شود (۴۶).

## ۲-۱-۶ تغییرات بیوشیمیایی و استراتیفیکاسیون

جنین نارس و وجود مواد بازدارنده سبب خواب فیزیولوژیکی می‌شود. یکی از روش‌ها برای از بین بردن آن قرار دادن بذر در شرایط سرد و مرطوب که اصطلاحاً استراتیفیکاسیون نامیده می‌شود می‌باشد. عموماً درجه حرارت پایین سبب کاهش سرعت واکنش‌های آنزیمی می‌شود. بنابراین انتظار می‌رود که فرآیندهای متابولیکی بذر در اثر سرما به تأخیر افتد. علی‌رغم این امر، اثرات مثبت تیمار سرما در تسریع جوانه‌زنی بذر مشاهده شده است. احتمال می‌رود که تیمار سرما در مهار برخی عوامل ممانعت

کننده‌ی جوانه‌زنی بذر نقش داشته باشد (۵۷). به عبارتی تیمار سرما می‌تواند برخی فرآیندهای القا-کننده‌ی خواب را ممانعت کرده یا اثرات دیگری را موجب شود. به طور کلی می‌توان تغییراتی را که به هنگام استراتیغیکاسیون به وقوع می‌پیوندد شامل تغییر در تنظیم کننده‌های رشد یا تغییر در حساسیت جنین نسبت به تنظیم کننده‌های رشد و تغییر در فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با شکستن مواد ذخیره‌ای بذر دانست. مواد ذخیره‌ای بذر به طور عمده شامل لیپیدهای ذخیره‌ای، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها هستند. در طی استراتیغیکاسیون هر سه نوع ماده ذخیره‌ای دستخوش تغییرات شده بطوری که لیپید-های ذخیره‌ای به اسیدهای چرب، پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک تبدیل شده و میزان کربوهیدرات‌های نامحلول همچون نشاسته تغییر می‌یابد (۵).

## ۲-۱-۷ پروتئین‌های ذخیره‌ای و جوانه‌زنی

پروتئین‌های ذخیره‌ای که در بذرها سنتز و ذخیره می‌شوند بعنوان منبع نیتروژن و کربن در طی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه مصرف می‌شوند. به هنگام شرایط مطلوب جوانه‌زنی این پروتئین‌ها تحت فرآیندهای پروتئولیتیکی قرار گرفته و می‌شکنند. شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان‌دهنده‌ی از بین رفتن مکانیسم بازدارنده در مقابل تجزیه می‌باشد. شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در دولپه‌ای‌ها بعد از خروج ریشه‌چه و اتمام دوران جوانه‌زنی صورت می‌گیرد (۵).

## ۲-۱-۸ آنزیم پروتئاز و جوانه‌زنی

اکثر پروتئین‌ها در اجسام پروتئینی ذخیره می‌شوند و به وسیله آنزیم‌های پروتولیتیک در طی جوانه‌زنی شکسته می‌شوند. این آنزیم‌ها باعث شکسته شدن پروتئین‌ها به آمینواسیدها و پپتیدهای کوچک‌تر می‌شود. پس از آزاد شدن آمینواسیدها از کمپلکس پروتئینی مربوطه، آمینواسیدها ممکن است به وسیله یکی از سه فرآیند زیر بیشتر تجزیه شوند: ۱- دی‌آمیناسیون، که تولید آمونیاک و اسکلت کربنی می‌کند که خود این ترکیبات بعدها در فرآیندهای متابولیکی مختلف وارد می‌شوند؛ ۲- ترانس-



آمیناسیون، آنزیم‌های ترانس‌آمیناسیونی تولید کتواسیدهایی را می‌کنند که برای تجزیه بیشتر آمینو-اسیدها به فرم  $\text{CO}_2$ ،  $\text{H}_2\text{O}$  و انرژی (ATP) وارد چرخه کربس می‌شوند و یا ۳- این مواد برای ساخت مولکول‌های پروتئینی جدید در سایر بخش‌های بذر در حال جوانه‌زنی به طور مستقیم استفاده می‌شود (۵). افزایش فعالیت آنزیم‌ها تحت تأثیر امواج فراصوتی از جمله آنزیم آلفا‌امیلاز، پروتئاز و لیپاز که دخیل در امر جوانه‌زنی می‌باشند مشاهده شده است (۷۹). گزارش شده است که افزایش سرعت جوانه‌زنی در بذره‌ای تیمار شده با امواج فراصوتی ناشی از افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و دهیدروژناز می‌باشد (۷۹). پروتئاز باعث کاهش پروتئین‌ها در بذره‌ای در حال جوانه‌زنی می‌شود که این کاهش با فعالیت آندو پروتئازها شروع شده، این آنزیم‌ها پروتئین‌های ذخیره‌ای نامحلول را به پپتیدهای محلول تبدیل می‌کند (۷۹ و ۹۷).

## ۹-۱-۲ آنزیم آرژیناز و جوانه‌زنی

اهمیت بیولوژیکی آرژیناز، به نقشش در کنترل سطح سلولی آرژینین و اورنتین که برای فعالیت متابولیسمی مختلف سلولی شامل ساخت پروتئین‌های جدید، پلی‌آمین‌ها، پرولین و نیتریک اکساید می‌باشد. آرژینین ترکیب غنی از نیتروژن، یکی از غالب‌ترین آمینواسیدها در بذر و برخی از اندام‌های ذخیره‌ای برخی گونه‌های گیاهی می‌باشد. آرژینین منبع آمینواسیدی است که جزئی اصلی بیشتر از ۶۰ درصد از آمینواسیدهای نیتروژنی در توسعه‌ی لپه‌ها است. در طول و بعد از جوانه‌زنی از پروتئین‌های ذخیره‌ای برای فراهم ساختن آمینواسیدها جهت ساختن پروتئین‌های جدید استفاده می‌شود (۱۱۰، ۲۲۰). آرژینیناز آرژینین را به اوره و اورنتین تبدیل می‌کند. اورنتین پیش‌سازهای بیوسنتز پلی‌آمین‌هایی همچون پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین می‌باشد. اوره موجود در واکنش اوره‌آزی به آمونیوم و  $\text{CO}_2$  تبدیل می‌شود. آمونیوم تولیدی جهت بیوسنتز اسیدهای آمینه توسط سیستم آنزیمی GS/GOGAT مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰۵).

بیوسنتز اسیدهای آمینه بعنوان یک مخزن متابولیکی فعال جهت مصرف آمونیوم تولیدی ناشی از فعالیت متوالی آرژینیناز و اوره‌آزی عمل می‌کند که این امر به نوبه خود زمینه‌ساز بیوسنتز سایر اسیدهای

آمینه می‌باشد. کوفاکتور آنزیم آرژیناز یون منگنز می‌باشد (۲۰۴). فعالیت آنزیم آرژیناز تحت تأثیر pH تغییر می‌یابد. pH بهینه برای فعالیت آنزیم آرژیناز در لپه‌های *Vigna catjang* و لپه‌های نخود به ترتیب ۱۰ و ۹/۱ گزارش شده است (۱۰۵). وجود آرژنین به مقدار زیاد در پروتئین‌های ذخیره‌ای بسیار مهم می‌باشد. آرژنین در مقایسه با سایر آمینواسیدها دارای نیتروژن بالایی می‌باشد. زیرا دارای گروه گوآنیدو می‌باشد. به طور کلی ۱۸٪ از نیتروژن کل بذر را آرژنین در بر می‌گیرد. در زمان جوانه‌زنی بذرها آمینواسیدهای غنی از نیتروژن، نیتروژن را برای متابولیسم‌های بعدی آزاد می‌سازند (۱۰۵ و ۱۱۰).

## ۲-۲- بررسی منابع ارزیابی مدل‌های رگرسیونی

### ۱-۲-۲ جوانه‌زنی و سبز شدن

جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه از مراحل بحرانی و مهم در چرخه زندگی گیاهان است (۲۱۶). جوانه‌زنی یک فرآیند فیزیولوژیک پیچیده است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد (۹۸ و ۱۶۱). عوامل محیطی تنظیم‌کننده جوانه‌زنی برای بذره‌های بدون کمون شامل دما، آب و اکسیژن می‌شود و برای بذره‌های دارای کمون علاوه بر این عوامل، به نور و محیط‌های شیمیایی نیاز می‌باشد (۵۶ و ۶۱). جوانه‌زنی یکی از مراحل مهم و حساس و فرآیند کلیدی در سبز شدن گیاهچه است (۷۰). سبز شدن به ظهور گیاهچه در سطح خاک گفته می‌شود (۷۰) و شامل دو مرحله جوانه‌زنی و رشد گیاهچه برای خروج از خاک است. سبز شدن یکی از مهم‌ترین مراحل فنولوژیکی گیاه است که تعیین‌کننده موفقیت یا شکست زراعت می‌باشد (۷۰). در تولید گیاهان، استقرار مناسب گیاه تعیین‌کننده تراکم بوته، یکنواختی و اهداف مدیریتی است (۹۹).

### ۲-۲-۲ اهمیت پیش‌بینی زمان سبز شدن

پیش‌بینی زمان سبز شدن، انتخاب تاریخ کاشت مناسب و استقرار سریع و کامل گیاهچه‌ها لازمه یک زراعت موفق است و از آن جایی که این موارد به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی مانند دما و رطوبت خاک قرار می‌گیرد بنابراین درک اساسی از سبز شدن و عوامل محیطی مؤثر بر آن در گیاهان زراعی ضروری می‌باشد (۱۹۱). سبز شدن سریع، یکنواخت و استقرار کامل گیاهچه‌های قوی (اجزای سبز شدن) می‌تواند به پوشیده شدن سریع سطح زمین و در نتیجه به افزایش عملکرد منتهی شود (۱۹۹). همچنین، استقرار پوشش کافی برای افزایش قدرت رقابت گیاه زراعی با علف‌های هرز ضروری است (۱۹۹). تأخیر و استقرار نامناسب گیاهچه از مشکلات مدیریتی مهم در مناطقی می‌باشد که گیاهان با تنش‌های خشکی، شوری و دمای پایین مواجه می‌شوند. از این رو، هر عاملی که از طریق کاهش سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی منجر به استقرار نامناسب و تراکم پایین گیاهچه شود، منجر به کاهش عملکرد

می‌گردد. اثرات شرایط نامطلوب در طول دوره جوانه‌زنی و مراحل اولیه رشد گیاه نسبت به سایر مراحل رشد مهم‌تر است. بنابراین، جوانه‌زنی خوب و مناسب تحت محدوده وسیعی از شرایط محیطی برای استقرار گیاهچه ضروری است (۶۹ و ۱۲۶).

## ۲-۲-۳ مدل‌ها و شبیه‌سازی

مدل‌سازی در مقایسه با سایر شاخه‌های علوم کشاورزی قدمت زیادی ندارد و مطالعات مربوط به آن از دهه ۷۰ میلادی شروع شده است. البته پیشرفت‌های چشم‌گیر علوم کشاورزی و گسترش سریع تکنولوژی اطلاعات باعث شد تا در طی ۳۰ سال گذشته تعداد قابل توجهی از مدل‌های کشاورزی طراحی و تکامل یابند (۹). از دلایل ساخت مدل‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- کاهش آزمایش‌های دراز مدت مزرعه‌ای در یک منطقه خاص

۲- تفسیر داده‌های اقلیمی بر حسب تولید بالقوه و محدودیت‌ها

۳- ارزیابی مدیریت گیاه و خاک

۴- ارزیابی ریسک عملیات مدیریتی در عملکرد

۵- شناخت بهتر از سیستم‌های بیولوژیکی و فیزیکی و اثرات متقابل آن‌ها .

پیش‌بینی‌های مدل در راهنمایی طراحان و محققان قبل از آزمایش‌های مزرعه‌ای نقش مفیدی دارند.

مدل‌ها قادرند به خوبی نشان دهند که آیا مدیریت خاص موجب افزایش عملکرد می‌شود یا خیر.

مدل‌ها نقش مهمی در ساخت داده‌ها و ایده‌ها دارند و قادرند نقاط ضعف شناخت یا دانش ما را معین

کنند. یک مدل گیاه توصیف ریاضی شناخت ما از رفتار گیاه است و به علت استفاده از ریاضیات بایستی

در هر مرحله کاملاً مشخص و معین باشد. نیاز به یک معادله ما را مجبور می‌سازد تا فرض کنیم و مدل،

جهت آزمون این فرض‌ها ساخته می‌شود. اگر پیش‌بینی‌های مدل از حقیقت، دقیق نباشد بایستی

پذیرفت که شناخت ما از سیستم مورد نظر کامل نیست (۹). در تقسیم‌بندی کلی مدل‌ها به دو دسته

مکانیسمی (نظری) و تجربی تقسیم می‌شوند. انواع تجربی مبتنی بر روابط مشتق شده از آنالیز رگرسیون

بوده و معمولاً نیازمند مقدار زیادی داده جهت ساخت هستند. عیب این نوع مدل‌ها این است که قابلیت استفاده در خارج از محدوده داده ساخته شده خود را ندارد. این مدل‌ها در واقع باز توصیف ریاضی از داده‌ها بوده و قادر به افزایش شناخت ما از داده‌ها نیستند (۹).

با استفاده از مدل‌های پیش‌بینی‌کننده جوانه‌زنی و سبز شدن می‌توان اندازه نهایی گیاه، زمان سبز شدن گیاه زراعی و علف‌های هرز، میزان کاهش عملکرد محصول در نتیجه رقابت با علف‌های هرز و زمان کنترل علف‌های هرز را برآورد کرد. از آن جا که کاهش عملکرد گیاهان زراعی در اثر رقابت با علف‌های هرز که در نتیجه تداخل زمان سبز شدن علف‌های هرز با محصولات زراعی به وجود می‌آید مشکل بزرگی در زراعت است و اگر علف‌های هرز قبل و یا همزمان با محصولات زراعی سبز شوند در مقایسه با حالتی که بعد از گیاه زراعی سبز شوند عملکرد را به میزان بیشتری کاهش می‌دهند، قابل ذکر است که پیش‌بینی سبز شدن علف‌های هرز در ارتباط با سبز شدن گیاهان زراعی برآورد کاهش عملکرد محصولات در نتیجه تداخل علف‌های هرز را بهبود می‌بخشد (۳۵). با توجه به مطالب فوق می‌توان به اهمیت دستیابی به مدل‌های پیش‌بینی‌کننده جوانه‌زنی و سبز شدن در گیاهان زراعی و علف‌های هرز پی‌برد، که از آن می‌توان برای بررسی شرایط مختلف محیطی استفاده کرد و به استقرار سریع، کامل و یکنواخت دست یافت (۳۵).

## ۲-۲-۴ توابع جوانه‌زنی

انواعی از توابع ریاضی برای شرح رابطه بین سرعت جوانه‌زنی و دما استفاده شده است (۱۹۳ و ۲۰۰). امتیاز این توابع این است که پارامترهای این مدل‌ها دارای مفهوم بیولوژیکی مانند دماهای کاردینال و سرعت ذاتی جوانه‌زنی و سبز شدن هستند. بنابراین، برخی از محققین از این مدل‌ها برای به‌دست آوردن دماهای کاردینال یعنی دمای پایه، دمای مطلوب و دمای سقف استفاده کرده‌اند (۱۱۶، ۱۱۷). توابع دمایی مختلفی برای توصیف واکنش جوانه‌زنی به دما وجود دارد. سه تابع دوتکه‌ای، بتا و دندان مانند برای بررسی واکنش جوانه‌زنی بذرها به دما بیشتر از بقیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۰۰). انتخاب

مدل مناسب برای کمی سازی واکنش سرعت جوانه زنی نسبت به دما، در تعیین دقیق دماهای کاردینال بسیار مهم است. اکرم قادری و همکاران (۱۳۸۷) در ارزیابی مدل های رگرسیون غیرخطی در کمی سازی سرعت جوانه زنی سه گیاه دارویی کدو تخم کاغذی، سیاه دانه و گل گاو زبان به دما به این نتیجه رسیدند که مدل دندان مانند نسبت به مدل های دیگر، واکنش سرعت جوانه زنی به دما را بهتر توصیف می کنند و از این مدل و پارامترهای برآورد شده از آن (دمای پایه، دمای مطلوب و دمای سقف) می توان در پیش بینی زمان جوانه زنی و سبز شدن استفاده کرد (۵).

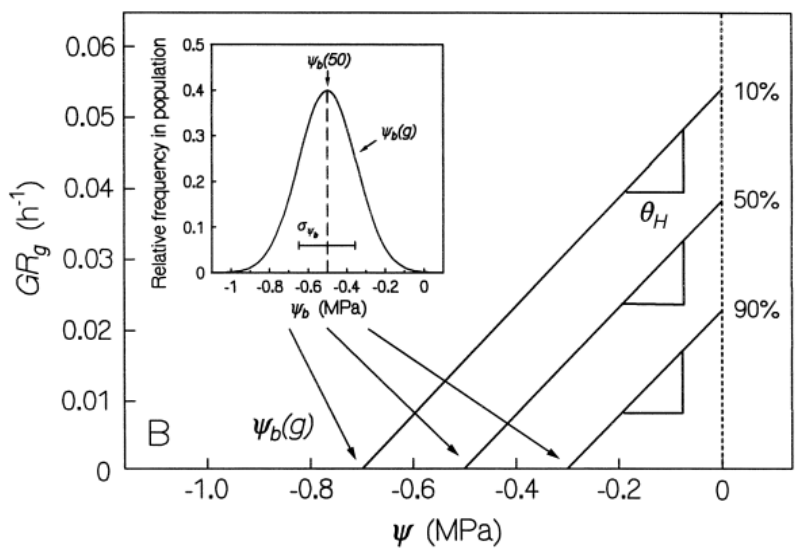
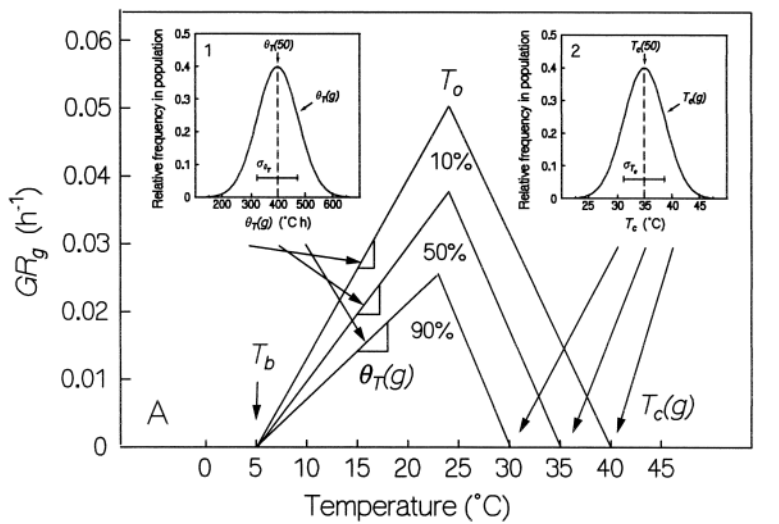
## ۲-۲-۵ اثر دما بر سبز شدن و جوانه زنی

دما ابتدایی ترین عامل محیطی تنظیم کننده کمون و جوانه زنی می باشد. دو اثر متمایز از دما شامل اثرگذاری بر کمون و سرعت جوانه زنی گزارش شده است (۷۰). تغییرات دمایی در طول فصل ها عاملی مؤثر در برطرف نمودن کمون اولیه و نیز چرخه ی کمون ثانویه می باشد بعنوان نمونه سرد شدن بذرها پس از آبنوشی سبب شکستن کمون می گردد (۱۲۲). نقش دوم درجه حرارت در جهت تکمیل جوانه زنی در بذور بدون کمون می باشد.

مدل های ریاضی جوانه زنی را در پاسخ به  $T$  (دما) توصیف می کنند. این مدل ها سرعت جوانه زنی را به صورت کسری یا درصد ( $GRg$  or  $1/t g$ )، معکوس مدت زمان جوانه زنی نشان می دهند. اثر دما بر جوانه زنی را می توان براساس دماهای کاردینال که فرآیند جوانه زنی در آن رخ می دهد بیان کرد (۷۰). سرعت نسبی جوانه زنی در یک دمایی و کمتر از آن صفر می شود که این دما، دمای پایه ( $T_{base}$ ) نامیده می شود، با افزایش دمای پایه، سرعت نسبی جوانه زنی به صورت خطی رو به افزایش می گذارد و در دمایی به نام دمای مطلوب به حداکثر میزان خود می رسد. برای محاسبه اثر دما بر جوانه زنی از ترمال تایم (زمان حرارتی) استفاده می شود. ترمال تایم ( $\theta_{T(g)}$ ) اندازه گیری زمان فیزیولوژیکی را فراهم و با جمع دماهای مؤثر بر جوانه زنی بیان می شود (۷۰). با افزایش دما بالاتر از دمای مطلوب، سرعت جوانه زنی

افزایش نیافته بلکه باعث کاهش جوانه‌زنی می‌گردد و سرانجام در دمایی به نام دمای سقف سرعت جوانه‌زنی به صفر می‌رسد و در دماهای بالاتر از دمای سقف نیز صفر خواهد شد (۴۰).

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود افزایش سرعت جوانه‌زنی با افزایش  $T$  در ناحیه زیر مطلوب (۹۰٪ درصد جوانه‌زنی)، با قوانین ترمودینامیک مفهوم می‌یابد. اغلب مقادیر  $T_0$  یا دمای مطلوب، پایین (حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد و به ندرت ممکن است که سبب دناتوره شدن پروتئین‌ها گردد. اثر دمای سقف بر غشاها سبب تغییر در ترکیبات غشایی می‌گردد که می‌تواند بر نقل و انتقالات لیپیدها یا پویایی مولکول‌های غشایی اثرگذار باشند،  $T_c$  یا دمای سقف سبب دناتوره شدن پروتئین‌ها می‌گردد و در نهایت پراکسیداسیون لیپید بذر را سبب می‌گرداند (۱۲۲).



شکل ۲-۲-۱- ارتباط بین سرعت جوانه‌زنی و دما. در زیر ناحیه‌ی مطلوب سرعت جوانه‌زنی  $GR_g=1/tg$ . به صورت درصد یا کسری از جمعیت بذری. با افزایش دما بعد از دمای پایه  $T_b$  جوانه‌زنی به صورت خطی افزایش می‌یابد (شیب خط برابر با معکوس نرمال تایم یا زمان حرارتی  $1/\theta_{T(g)}$  برای جوانه‌زنی می‌باشد که در بذره‌های گونه‌های مختلف با توزیع نرمال متفاوت است (شکل A). و در  $T_0$  یا دمای مطلوب به بالاترین سطح خود می‌رسد و بعد از این دما سرعت جوانه‌زنی  $GR_g$  به صورت خطی کاهش می‌یابد و در دمای سقف  $T_{c(g)}$  جوانه‌زنی به صفر می‌رسد. دمای سقف برای جوانه‌زنی  $T_{c(g)}$  در میان نسبت‌های بذری مختلف با توزیع نرمال متفاوت است (شکل B): ارتباط بین سرعت جوانه‌زنی و پتانسیل آب ( $\Psi$ )، با کاهش میزان  $\Psi$ ، سرعت جوانه‌زنی با درصدهای مختلفی به طور خطی با شیب  $1/\theta_H$  کاهش می‌یابد. مقادیر مختلف پتانسیل آب پایه  $(\Psi_{(b)(g)})$ ، با توزیع نرمال در جمعیت بذری که محور X را در نقاط مختلف قطع می‌کند (اقتباس از ۷۰).

در زمینه تعیین دماهای کاردینال و بررسی مؤلفه‌های جوانه‌زنی و سبز شدن در واکنش به دما در گیاهان مختلف از جمله گندم، سورگوم، شبدر زیرزمینی، کلزا، نخود، عدس، سویا، لوبیا و گیاهان دیگر تحقیقات متعددی صورت گرفته است (۴، ۱۲۶ و ۱۹۹). کامکار و همکاران (۱۳۹۴) در مطالعه کمی-سازگی گیاه دارویی آزیوش واکنش جوانه‌زنی به دما تا رسیدن زمان تا رسیدن به  $10 (D_{10})$ ،  $50 (D_{50})$  و  $90 (D_{90})$  درصد حداکثر جوانه‌زنی سه مدل رگرسیون غیرخطی (مدل دوتکه‌ای، دندان مانند و بتا) ارزیابی نموده و مدل بتا را به عنوان مدل برتر معرفی نمودند. دماهای کاردینال در  $50$  درصد حداکثر جوانه‌زنی شامل دمای پایه  $10/18$ ، دمای بهینه‌ی  $37/31$ ، دمای سقف  $50$  و زمان بیولوژیک  $13/56$  ساعت بود (۱۲).

## ۲-۲-۶ تأثیر رطوبت بر جوانه‌زنی و سبز شدن

علاوه بر دما، پتانسیل آب خاک نیز یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که بر جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه تأثیر می‌گذارد (۴۲). توانایی جوانه‌زنی بذرها تحت شرایط رطوبتی متفاوت، احتمال استقرار بیشتر گیاه و تراکم بالاتر را در پی دارد، که در نتیجه منجر به افزایش عملکرد می‌شود (۵۳). به‌طور



معمول درصد جوانه‌زنی با بهبود قابلیت دسترسی به آب به صورت خطی افزایش می‌یابد (۱۰۸) و سرعت جوانه‌زنی با کاهش پتانسیل آب کاهش می‌یابد (۱۰۷). در مورد اثرات تنش خشکی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه و همچنین عملکرد در گیاهان مختلف گزارش‌های زیادی وجود دارد. نوذری‌نژاد و همکاران (۱۳۹۱) نیز در کمی‌سازی اثر دما و پتانسیل آب بر جوانه‌زنی و سبز شدن گندم نشان دادند از میان توابع استفاده شده تابع دندان مانند واکنش سرعت جوانه‌زنی به دما و پتانسیل آب را بهتر از بقیه توابع توصیف می‌کند (۳۴). خدابخشی و همکاران (۱۳۹۲) در کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی گیاه دارویی مرزه به دما و پتانسیل آب با استفاده از مدل رگرسیون غیرخطی بیان داشتند تأثیر دما، پتانسیل آب و اثر متقابل آن‌ها بر حداکثر سرعت جوانه‌زنی و زمان تا رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بود؛ همچنین با کاهش پتانسیل آب، درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت. آن‌ها سه مدل رگرسیون غیرخطی شامل مدل دو تکه‌ای، دندان مانند و بتا مدل بتا به عنوان مدل برتر انتخاب و دماهای پایه، مطلوب و سقف به ترتیب  $7/56^{\circ}\text{C}$ ،  $23/98^{\circ}\text{C}$  و  $40^{\circ}\text{C}$  و زمان بیولوژیک جوانه‌زنی در پتانسیل صفر (تیمار شاهد) ۹۱/۱۷ ساعت برآورد نمودند؛ آن‌ها در نتایج‌شان گزارش نمودند که دماهای کاردینال به طور معنادار تحت تأثیر پتانسیل آب قرار نگرفت، اما زمان بیولوژیک جوانه‌زنی به ازای کاهش یک مگاپاسکال آب، ۱۷/۶۴ ساعت افزایش یافت (۱۲).

## ۲-۳ بررسی منابع اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در استویا

### و سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای

#### ۲-۳-۱ اسید جاسمونیک

اسید جاسمونیک و متیل استر آن (متیل جاسمونات)، ترکیب‌هایی سیکلوپنتانی از مشتقات اسید لینولنیک می‌باشند که از طریق مسیر اکتادکانوئید (Octadecanoid pathway) ساخته می‌شوند و در گیاهان عالی توزیع وسیعی دارند (۶۳ و ۱۷۹). این ترکیب‌ها فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی نظیر رسیدن میوه، رشد ریشه، پیری، واکنش‌های دفاعی در برابر پاتوژن‌ها و حمله حشرات و واکنش گیاه به زخم و تنش‌های غیرزیستی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸۳ و ۱۵۰). اسید جاسمونیک و متیل جاسمونات به عنوان مولکول‌های سیگنال فعالیت می‌کنند و به عنوان یک گروه از انتقال دهندگان مهم پیام در دفاع از گیاه در برابر زخم، حشره، حمله‌ی پاتوژن و غیره می‌باشند (۱۷۹). این مولکول‌های سیگنال در برخی از مسیرهای انتقال پیام که القا کننده آنزیم‌های خاص کاتالیزکننده واکنش‌های بیوسنتزی برای تشکیل ترکیب‌های دفاعی مثل پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها یا پروتئین‌های مربوط به پاتوژن هستند، دخالت می‌کنند و منجر به القای واکنش‌های دفاعی می‌شوند. گزارش شده است که وقتی این مولکول‌های پیام‌رسان به صورت خارجی استفاده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده و منجر به بیان برخی از ژن‌های دفاعی می‌گردند (۷).

#### ۲-۳-۲ اسید سالیسیلیک

اسید سالیسیلیک یک مولکول پیام‌رسان طبیعی با ماهیت فنولی است که فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی مانند تغییر در جذب مواد غذایی، وظایف غشا، روابط آبی، اعمال روزنه‌ای، جلوگیری از سنتز اتیلین، افزایش رشد و تعدیل در برابر عوامل تنش‌زا را سبب می‌شود. اسید سالیسیلیک به عنوان یک مولکول پیام‌رسان داخلی با مسیر پیام‌رسانی رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر هم‌کنش دارد. تیمار با

سالیسیلیک اسید خارجی باعث تجمع پراکسیداسیون هیدروژن در آرویدوپسیس، تنباکو و خردل گردید (۱۸۰). اگرچه مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد مخرب می‌باشد و باعث آسیب‌های سلولی و حتی مرگ گیاه می‌شود، با وجود این مقادیر کم رادیکال‌های اکسیژنی به ویژه پراکسید هیدروژن نقش سیگنالی داشته، مسیرهای دفاعی خاصی مانند سنتز برخی هورمون‌ها نظیر جاسمونات، سالیسیلیک اسید، اتیلن و یا سنتز یا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را فعال می‌کند. سالیسیلیک اسید در القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی نقش دارد و از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و به تأخیر انداختن پیری موجب حفاظت گیاهان و طولانی‌تر شدن دوره‌ی حیات آنها می‌شوند (۱۸۰).

### ۲-۳-۳ اسید جاسمونیک و سالیسیلیک و متابولیت‌های ثانویه

مطالعات متعددی بر نقش این دو هورمون بر میزان میزان متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است، در گیاه کنگر فرنگی تحت اثر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده است که تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنلی و فلاونوئید تحت تأثیر نسبت‌های مختلف متحرک قرار داشته و نسبت به هم همبستگی نشان دادند که بیان‌گر نقش PAL در تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی است (۲۴). تیمار با متیل جاسمونات بعد از ۴۸ ساعت در گیاهچه‌های ۴ برگی برنج سبب تجمع اسیدهای فنولیک و افزایش ۸۰ درصدی فعالیت آنزیم PAL گردید (۶۲). متیل جاسمونات در میوه‌های گوا باعث افزایش فعالیت PAL شد اما مقدار فنل کل را تحت تأثیر قرار نداده بود (۱۰۴). در یک مطالعه تأثیر متیل جاسمونات را بر میزان استویوزید و ریبودیوزاید A و بیان ژن کائورنوئیک اسید ۱۳- هیدروکسیلاز در گیاه استویا در شیشه مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که تیمار متیل- جاسمونات در غلظت ۲۰ میکرومولار سبب افزایش ریبودیوزاید A شده بود و در غلظت‌های بالا اثر منفی داشت، از آنجا که جاسمونات‌ها در ایمنی گیاه نقش کلیدی دارند نتایج نشان می‌دهد که عملکرد این گلیکوزیدها می‌تواند در پاسخ‌های دفاعی به پاتوژن‌های خارجی یا آسیب‌های فیزیکی باشد (۳۳). در یک مطالعه تأثیر غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار اسید جاسمونیک بر میزان اسانس آویشن

باغی مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شد که غلظت ۲۰۰ میکرومولار اسید جاسمونیک سه ترکیب تیمول، کارواکرول و پی‌سایمن موجود در اسانس را افزایش داده بود (۸). در مطالعه اثر اسید جاسمونیک بر سنتز ترکیبات ترپنویید در گیاه شاهدانه در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار در مرحله‌ی رویشی گزارش شده است که تیمارهای ۱ و ۵ میکرومولاری اسید جاسمونیک باعث افزایش سطح تتراهیدروکانابینول (مهم‌ترین ترکیب دارویی این گیاه) شد، و نیز بیان داشتند که اسید جاسمونیک انباشت ترپنوییدهای اولیه و ثانویه را در کلروپلاست تحریک می‌کند (۲۱). گزارش شده است که اسید جاسمونیک باعث القای مسیر بیوسنتزی پلاستییدی ترپنوییدها می‌شود (۴۱). نتایج کار (۲۱) نشان داد که اسید جاسمونیک یک تنظیم‌کننده‌ی کلیدی در القای سنتز ترکیبات ترپنوییدی است.

## ۲-۳-۴ اسید جاسمونیک و سالیسیلیک و رشد گیاه

ساختار مولکول کلروفیل شامل حلقه‌ی پورفیرین، دم فیتولی و یون  $Mg^{2+}$  است، دم فیتولی یک دی‌ترین ۲۰ کربنه است که از مسیر کلروپلاستی سنتز می‌شود. در مورد تأثیر اسید جاسمونیک بر رنگدانه‌های فتوسنتزی نتایج متضادی وجود دارد. در بررسی اثر اسید جاسمونیک بر ترکیبات ترپنوییدی در گیاه شاهدانه گزارش شده است که تیمار اسید جاسمونیک در تمامی غلظت‌ها سبب افزایش معنی‌دار کلروفیل a گردید؛ کلروفیل b تحت تأثیر غلظت ۵ میکرومولار اسید جاسمونیک افزایش و تحت تأثیر ۱۰۰ میکرومولار کاهش یافت و سطح کلروفیل کل در همه‌ی تیمارها افزایش یافت (۲۱). گزارش شده است که تیمار متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار پس از دو روز متوالی سبب کاهش میزان کلروفیل شده است. آنها در نتایج‌شان بیان داشتند که هورمون متیل جاسمونات در غلظت پایین نقش تحریک‌کننده و در غلظت بالا سبب بازدارنده‌گی رشد می‌گردد (۱۳۰). گزارش شده است که کاربرد متیل جاسمونات باعث افزایش شدت فعالیت میتوزی گردید (۷۲)، و جاسمونات‌ها سبب افزایش شدید محتوای پروتئین در ریشه و ساقه کلزا گردیدند (۸۵).

# فصل سوم: مواد و روش

## ۳-۱ مواد و روش اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی

### ۳-۱-۱ معرفی طرح آزمایشی اول

در این مطالعه از رقم *Echinacea purpurea* L. تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان استفاده شد. به منظور بررسی تأثیر امواج فراصوتی بر فعالیت برخی آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، قندها و کلروفیل در سرخارگل در سال زراعی ۱۳۹۶ در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۵ مدت اعمال تیمار با امواج فراصوتی ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک (Elmasonic, Germany) با قدرت ثابت ۵۰ وات بود. ۳۰ عدد بذر سرخارگل درون هر پتری‌دیش قرار داده شد. ۵ تیمار در اتاقک رشد در دمای ۲۵ °C قرار گرفت. جوانه‌زنی هر ۱۲ ساعت بررسی گردید. معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیشتر بود (۳۷).

در کلیه تیمارهای دمایی، برای هر تکرار منحنی پیشرفت جوانه‌زنی در مقابل زمان (ساعت) ترسیم و زمان لازم برای ۵۰ درصد (D50) جوانه‌زنی از طریق درون‌یابی برآورد گردید. همچنین معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی ( $1/D50$ ) به عنوان سرعت جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (۲۰). درصد جوانه‌زنی با تقسیم تعداد بذره‌ای جوانه زده به کل تعداد بذره‌ای مورد استفاده ضرب در ۱۰۰ به دست آمد. محاسبات مورد نیاز با استفاده از برنامه جرمین (Germin) انجام شد (۲۰).

در این آزمایش برخی خصوصیات جوانه‌زنی، میزان و کارایی استفاده از ذخایر بذر، طول گیاهچه (طول ریشه‌چه + طول ساقه‌چه به سانتی‌متر)، وزن خشک گیاهچه و سپس پارامترهای بیوشیمیایی از جمله آنزیم آلفا‌آمیلاز، پروتئاز، آرژیناز، الکل‌دهیدروژناز، گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز و گلوکاتیون ردوکتاز، میزان پروتئین محلول و کل، قندها و کلروفیل محاسبه گردید.

### ۲-۱-۳ استخراج عصاره آنزیم آلفا آمیلاز

جهت استخراج عصاره از بذره‌های سرخارگل پس از طی ۲۴ ساعت از جوانه‌زنی استفاده گردید. ۰/۲ گرم از بذر جوانه‌زده با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار با  $\text{pH} = 4/8$  هموژن گردید. سپس عصاره حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، بمدت ۱۰ دقیقه و دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ گردید. فاز شفاف رویی بمدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری در دمای  $75^{\circ}\text{C}$  به منظور غیرفعال کردن آنزیم بتا آمیلاز قرار داده شد (۱۰۹).

### ۳-۱-۳ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از روش مندرج در منبع شماره ۴۰ استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی، ۰/۵ میلی‌لیتر نشاسته یک درصد و ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج بود که با ورتکس با هم مخلوط شدند و سپس در بن‌ماری بمدت ۱۵ دقیقه در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر معرف ۵ و ۳ دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. سپس مخلوط حاصل بمدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Unico, chine) قرائت گردید. آنگاه با منحنی استاندارد مالتوز، فعالیت آلفا آمیلاز بر اساس قند احیایی تشکیل شده ( $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) تعیین گردید (۱۰۹).

### ۴-۱-۳ استخراج قندها

برای استخراج قندهای محلول از بذره‌های تازه جوانه‌زده (۰/۰۵ گرم) با اتانول بر اساس روش اوموکولو و همکاران همراه با تغییراتی انجام شد (۱۷۵).

### ۵-۱-۳ اندازه‌گیری قند کل

برای اندازه‌گیری قند کل از روش (۱۵۷) استفاده شد.

### ۶-۱-۳ اندازه‌گیری قندهای احیایی

اندازه‌گیری قندهای احیایی براساس روش (۱۶۴) صورت گرفت.

### ۳-۱-۷ اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی

برای اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی از روش (۱۱۴) استفاده شد.

### ۳-۱-۸ اندازه‌گیری کلروفیل

جهت سنجش این پارامتر استخراج از روش (۴۶) و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل از روش (۲) استفاده

گردید.

### ۳-۱-۹ هدایت الکتریکی

به منظور اندازه‌گیری هدایت الکتریکی ۳۰ عدد بذر در ۴ تکرار وزن شده و در بشرهای حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد. بشرها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰°C قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی قرائت شد. عدد حاصل بر وزن بذرها تقسیم شده و میزان هدایت الکتریکی به صورت میکروزیمنس بر متر بر گرم محاسبه شد (۱۱۳).

### ۳-۱-۱۰ استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن

استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن از روش (۱۲۹) صورت گرفت.

### ۳-۱-۱۱ استخراج عصاره برای سنجش آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و

#### پلی فنل اکسیداز

استخراج به روش کار و میسرا انجام شد (۱۳۳). مقدار ۰/۰۵ گرم بافت تر گیاهچه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با  $\text{pH} = 6/8$  در هاون چینی سرد هموژن گردید. آنگاه بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد.



### ۱۲-۱-۳ تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز بر اساس روش (۷۷) همراه با تغییراتی انجام شد. مخلوط واکنش به حجم ۳ میلی لیتر شامل ۲/۷ میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار با  $\text{pH} = 6/8$ ، گایاکول ۰/۶ مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر)، آب اکسیژنه ۱/۲ مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، بود. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. بلانک فاقد آب اکسیژنه بود. افزایش جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر در ۱ دقیقه اول بعد از افزودن آب اکسیژنه اندازه گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میکرومول تترایاکول تشکیل شده ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر با  $26/6 \text{ m M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$  در دقیقه به ازای یک میلی گرم پروتئین بیان گردید.

### ۱۳-۱-۳ تعیین عالیت کاتالاز

سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس روش (۷۷) همراه با تغییراتی انجام شد. مخلوط واکنش به حجم ۳ میلی لیتر شامل ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با  $\text{pH} = 6/8$ ، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر)، آب اکسیژنه ۰/۴۵ مولار اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. محلول بلانک فاقد آب اکسیژنه بود. کاهش میزان جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر در ۱ دقیقه اول بعد از افزودن آب اکسیژنه قرائت گردید. در نهایت فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر با  $40 \text{ m M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$  در دقیقه به ازای یک میلی گرم پروتئین بیان گردید.

### ۱۴-۱-۳ تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم بر اساس روش (۱۳۳) با تغییراتی انجام شد. مخلوط واکنش به حجم ۳ میلی - لیتر شامل ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار با  $\text{pH} = 6/8$ ، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) و پیروگال ۰/۳ مولار بود. با اضافه کردن پیروگال به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی آغاز شد. تغییرات

جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر در ۱ دقیقه اول اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت ویژه‌ی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بر اساس میکرومول پورپوروگالین تشکیل شده، ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر  $m M^{-1}Cm^{-1}$  <sup>۱</sup> ۲/۴۷ در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

### ۳-۱-۱۵ استخراج عصاره‌ی گلوکاتایون S ترانسفراز

جهت استخراج ۰/۰۵ گرم بافت تر گیاهچه با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی سرد هموژن گردید. بافر استخراج شامل فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۷/۵، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVPP) ۰/۶ درصد، تریتون X-100 یک درصد، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) یک میلی‌مولار و بتامرکاپتواتانول ۱ میلی‌مولار می‌باشد. پس از هموژن به درون میکروتیوپ ریخته و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، دمای  $4^{\circ}C$  و مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده گردید (۷۳).

### ۳-۱-۱۶ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون S-ترانسفراز

مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل شامل ۸۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۷/۵، GSH ۳/۶ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر)، ۱-کلرو، ۲ و ۴- دی نیترو بنزن یک میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر) و عصاره بود (۵۰ میکرولیتر) بود. افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. از فعالیت آنزیم در ۱ دقیقه دوم برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر  $m M^{-1}Cm^{-1}$  ۹/۶ در دقیقه به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۷۴).

### ۳-۱-۱۷ استخراج عصاره آنزیم الکل دهیدروژناز

برای استخراج آنزیم ۰/۲ گرم بذر سرخارگل ۲۴ ساعت پس از آبنوشی با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی سرد ساییده و هموژنیزه گردید. آنگاه از دو لایه پارچه ملامل عبور داده شد و عصاره حاصل به میکروتیوپ‌ها، منتقل شد. میکروتیوپ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در  $12000\text{ rpm}$  و دمای  $4^{\circ}C$

سانتریفیوژ گردید و پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی (شفاف) برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت (۳۷).

### ۳-۱-۱۸ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز به روش (۳۷) انجام شد. در این روش ۱۰۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی ۰/۸ میلی‌لیتر بافر تریس ۶۲/۵ میلی‌مولار با pH برابر با ۹، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پایه NAD ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۰۵ میکرولیتر اتانول خالص بود. با اضافه کردن اتانول خالص به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد. محلول بلانک فاقد اتانول خالص بود. تغییرات جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز بر اساس اتانول تجزیه شده در هر دقیقه به ازای هر گرم بافت بذر تازه جوانه‌زده با ضریب خاموشی (E) برابر با  $62200 \text{ L}\cdot\text{mm}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  بیان شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در یک دقیقه اول استفاده شد.

### ۳-۱-۱۹ استخراج عصاره آنزیم گلوکز - ۶ - فسفات دهیدروژناز

برای تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی از بافر استخراج حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۸، سولفات منیزیم یک میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) یک میلی‌مولار، پلی‌وینیل‌پیرولیدین ۰/۶ درصد، فنیل‌متیل سولفونیل فلوراید یک میلی‌مولار و  $\beta$  - مرکاپتواتانول ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. ۰/۵ گرم بافت لپه با محور جنینی درهاون چینی سرد با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج هموژن گردید. هموژن حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ گردید و پس از سانتریفیوژ، فاز شفاف (میانی) برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۱-۲۰ اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز به روش (۸۹) همراه با تغییراتی جزئی انجام شد. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تریس ۵۰ میلی مولار و کلرید منیزیم ۱ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر محلول پایه ی  $\text{NADP}^+$  ۰/۱ میلی مولار، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر عصاره ی آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر محلول پایه ی G-6-P بود، با افزودن G-6-P به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی آغاز شد. بلانک فاقد G-6-P بود. افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Unico, Chinese ثبت گردید. ضریب خاموشی  $\text{NADPH}$  در طول موج ۳۴۰ نانومتر برابر  $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  می باشد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور نور در دقایق ۱ الی ۳ استفاده گردید. فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز بر حسب نانومول G-6-P اکسید شده بر دقیقه بر گرم وزن تر بافت گیاهی بیان گردید.

### ۳-۱-۲۱ استخراج عصاره آنزیم آرژیناز

یک گرم بافت لپه ای به همراه محور لپه ای با ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج در محیط سرد هموژن گردید. بافر استخراج شامل ۰/۱ مولار تریس، ۰/۵ مولار مالانریال، یک میلی مولار EDTA، ۰/۱ میلی-مولار PMSF و ۲- مرکاپتواتانول v/v ۱٪ بود. هموژن حاصل، از ۴ لایه توری مل مل گذرانده شد. سپس بمدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm و دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف میانی برای اندازه گیری آنزیم استفاده شد (۳۸). قبل از اندازه گیری فعالیت آنزیم آرژیناز، آنزیم با انکوبه کردن عصاره با ۱۰۰ میلی مولار  $\text{Mn}^{+2}$  در دمای ۳۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با نسبت ۰/۹ میلی لیتر عصاره ی آنزیمی و ۰/۱ میلی لیتر  $\text{Mn}^{+2}$  ۱۰۰ میلی مولار فعال گردید (۱۰۳).

### ۳-۱-۲۲ اندازه گیری فعالیت آنزیم آرژیناز

- محلول حد واسط (Intermediate solution) شامل L-arginine ، ۲۲۵ میلی مولار و  $2 \text{ MnCl}_2$

میلی مولار با pH برابر با ۹/۷

جهت اندازه گیری فعالیت آرژیناز از روش (۱۰۵) استفاده شد. مخلوط واکنش به حجم ۳ میلی لیتر که شامل ۳۰۰ میکرو لیتر عصاره ی آنزیمی فعال شده به همراه ۲۷۰۰ میکرو لیتر محلول حد واسط بود. مخلوط واکنش در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  بمدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. هر ۵ دقیقه ۰/۷ میلی لیتر از مخلوط واکنش برداشته شده و آزاد شدن اورنتین از آرژنین به وسیله ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد (۸۴). بلانک (عصاره ی آنزیمی) بمدت ۳۰ دقیقه در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد؛ گرما سبب غیرفعال شدن آرژیناز می گردد.

### ۳-۱-۲۳ استخراج آنزیم پروتئاز

استخراج آنزیم از روش (۱۵۳) صورت گرفت. برای استخراج عصاره جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم پروتئاز از بذره های سرخارگل پس از طی ۲۴ ساعت از جوانه زنی استفاده گردید. ۰/۲۵ گرم از بذر جوانه زده با ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با  $\text{pH} = 7/5$  هموژن گردید. سپس عصاره حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، بمدت ۱۵ دقیقه و دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای فعالیت آنزیم استفاده شد.

### ۳-۱-۲۴ اندازه گیری فعالیت آنزیم پروتئاز

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پروتئاز از روش (۱۵۳) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی - لیتر از بافر فسفات، ۰/۲۵۰ میلی لیتر عصاره و در نهایت حجم مخلوط واکنش به یک میلی لیتر رسانده شد. واکنش با اضافه کردن یک میلی لیتر کازین یک درصد آغاز شد؛ مخلوط واکنش بمدت ۲ ساعت در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد؛ واکنش با اضافه کردن ۳ میلی لیتر، TCA، ۵ درصد متوقف شد؛ سپس

بمدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت میزان پروتئین محلول با روش (۶۸) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

### ۳-۱-۲۵ استخراج عصاره‌ی آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز

استخراج عصاره از روش (۷۳) انجام شد.

### ۳-۱-۲۶ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز

مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۵ (۸۷۰ میکرولیتر)، گلوکاتایون اکسید شده (GSSG) ۲ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر)، بتا نیکوتین آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات ۲ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر) و عصاره (۳۰ میکرولیتر) بود. کاهش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر  $6/22 \text{ m M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$  دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. از فعالیت آنزیم در ۱ دقیقه اول برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد (۷۳).

### ۳-۱-۲۷ استخراج پروتئین محلول

به‌منظور اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش (۶۸) استفاده شد.

### ۳-۱-۲۷-۱ بافر استخراج پروتئین محلول

ترکیب بافر استخراج با pH معادل ۸ شامل تریس ۰/۱ مولار، کلرید پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار، سولفات منیزیم ۱ میلی‌مولار، اتیلن‌دی‌آمین تتراستیک‌اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدین ۰/۵ درصد بود.

### ۳-۱-۲۷-۲ معرف برادفورد

برای تهیه معرف برادفورد ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بریلیانت بلو G-250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به آن اضافه گردید و در انتها حجم

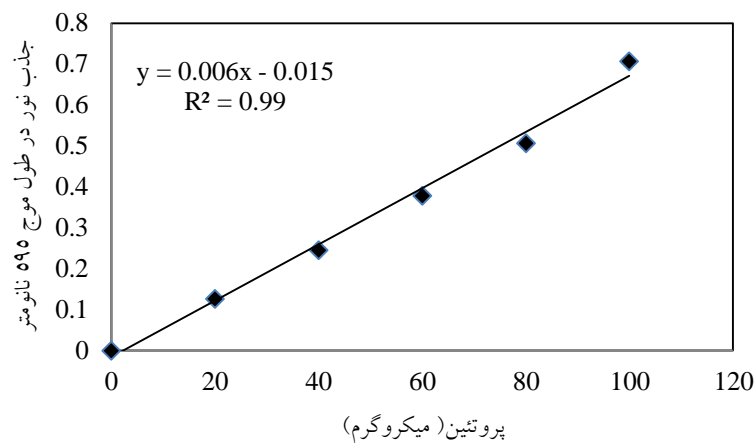
نهایی با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول فوق توسط کاغذ صافی واتمن صاف شده و در دمای ۴ °C نگه داری گردید.

### ۳-۱-۲۷-۳ تهیه نمودار استاندارد پروتئین محلول

برای تهیه نمودار استاندارد پروتئین محلول، از محلول سرم آلبومین با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. به لوله‌های فالکون مقادیر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پایه آلبومین که به ترتیب حاوی ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم آلبومین بود، اضافه شد. در نهایت حجم لوله‌های فالکون با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله فالکون که فاقد محلول پایه آلبومین بود به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به تک تک لوله‌های فالکون ۵ میلی لیتر معرف برادفورد اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه ورتکس و پس از گذشت ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. سپس مطابق جدول ۳-۱-۱ از روی مقادیر مختلف جذب به دست آمده در طول موج ۵۹۵ نانومتر به ازای مقادیر مختلف پروتئین، نمودار استاندارد رسم گردید (شکل ۳-۱-۱).

جدول ۳-۱-۱- طرز تهیه نمودار استاندارد پروتئین محلول.

شماره لوله فالکون	محلول آلبومین (میکرو لیتر)	آب مقطر (میکرو لیتر)	معرف برادفورد (میلی لیتر)	جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر
۱	۰	۱۰۰	۵	۰
۲	۲۰	۸۰	۵	۰/۱۲۷
۳	۴۰	۶۰	۵	۰/۲۴۶
۴	۶۰	۴۰	۵	۰/۳۷۹
۵	۸۰	۲۰	۵	۰/۵۰۷
۶	۱۰۰	۰	۵	۰/۷۰۷



شکل ۳-۱-۱- نمودار استاندارد پروتئین محلول

### ۳-۱-۲۸ اندازه‌گیری پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول، ۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به لوله‌های فالکون منتقل و به آن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. به محلول حاصل ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. بعد از ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

### ۳-۱-۲۹ محلول‌های مورد نیاز استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل

۳-۱-۲۹-۱ بافر نمونه (۱۳۶) ترکیب بافر نمونه شامل باز تریس ۰/۰۶ مولار با pH برابر با ۶/۸،

سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲ درصد و گلیسرول ۱۰ درصد.

الف) محلول  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ۲ درصد، NaOH ۰/۳ درصد

تارتارات سدیم ۰/۱۶ درصد، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱ درصد

ب) محلول  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ۴ درصد

ج) مخلوط معرف‌های الف و ب با نسبت حجمی ۱۰۰ به ۱ برای تشکیل مس قلیایی

د) معرف فولین رقیق شده با آب مقطر با نسبت حجمی ۱:۱.

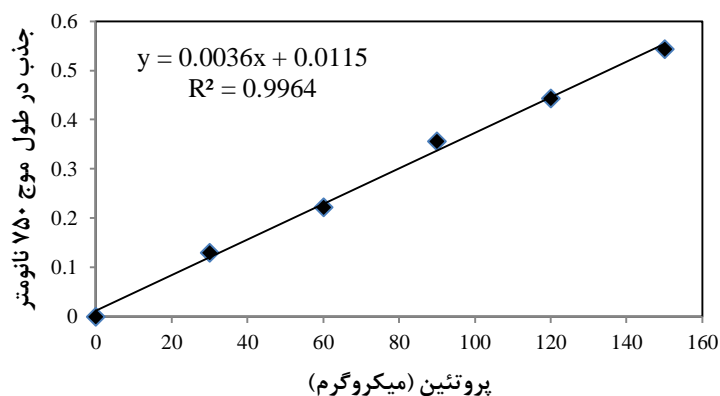


### ۳-۱-۲۹-۲ تهیه نمودار استاندارد پروتئین کل

برای تهیه نمودار استاندارد پروتئین کل، از محلول سرم آلبومین با غلظت ۱ میلی گرم در یک میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. به لوله‌های فالکون مقادیر ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از محلول پایه آلبومین که به ترتیب حاوی ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکروگرم پروتئین بود، اضافه شد. در نهایت حجم لوله‌های فالکون با آب مقطر به ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ی فالکونی که فاقد محلول پایه‌ی آلبومین بود به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به تک تک لوله‌های فالکون ۳ میلی لیتر معرف "ج" اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت؛ در ادامه ۰/۳ میلی لیتر معرف فولین رقیق شده به آن اضافه شد و به شدت ورتکس گردید بعد از ۴۵ دقیقه جذب نور در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت گردید. سپس مطابق جدول ۳-۱-۲ از روی مقادیر مختلف جذب بدست آمده به ازای مقادیر مختلف پروتئین در طول موج ۷۵۰ نانومتر نمودار استاندارد پروتئین رسم شد.

جدول ۳-۱-۲- طرز تهیه نمودار استاندارد پروتئین کل به روش (۵۵)

شماره لوله فالکون	محلول آلبومین ( $\mu\text{L}$ )	آب مقطر (mL)	محلول "ج" ) (mL)	معرف فولین (mL)	جذب نور در طول موج ۷۵۰ nm
۱	۰	۱۰۰۰	۳	۰/۳	۰
۲	۳۰	۹۷۰	۳	۰/۳	۰/۱۳
۳	۶۰	۹۴۰	۳	۰/۳	۰/۲۲۲
۴	۹۰	۹۱۰	۳	۰/۳	۰/۳۵۶
۵	۱۲۰	۸۸۰	۳	۰/۳	۰/۴۸۲
۶	۱۵۰	۸۵۰	۳	۰/۳	۰/۵۴۴



شکل ۳-۱-۲- نمودار استاندارد پروتئین کل به روش (۱۵۵).

### ۳-۱-۳ استخراج پروتئین کل

استخراج پروتئین کل با روش (۱۵۵) همراه با تغییراتی انجام شد. ۰/۰۵ گرم بافت برگ با ۲ میلی لیتر بافر نمونه هموزن گردید. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در بن ماری در دمای ۹۰ °C قرار گرفتند و هر ۱۰ دقیقه شیک شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه، سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. از فاز بالایی به میکروتیوپ دیگری منتقل شد و این عمل بر روی بقایای ته میکروتیوپ دوباره تکرار گردید و بعد از سانتریفیوژ به عصاره‌ی اول اضافه گردید و در نهایت برای سنجش پروتئین کل استفاده شد.

### ۳-۱-۳ اندازه‌گیری پروتئین کل

برای اندازه‌گیری پروتئین کل از روش (۱۵۵) استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتئین کل ۸۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس ۳ میلی لیتر معرف "ج" به آن افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. سپس ۰/۳ میلی لیتر از معرف فولین رقیق شده به آن اضافه شد و به شدت ورتکس شد؛ بعد از ۴۵ دقیقه جذب نور در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت گردید.

## ۳-۱-۳۲ اجرای طرح آزمایشی دوم

در آزمایش دوم به منظور بررسی اثر پیش تیمار بذر با امواج فراصوتی - دمای محیط انکوباتور برای جوانه زنی و استراتیفیکاسیون بر جوانه زنی بذر سرخارگل آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۱۳ تیمار و سه تکرار انجام شد.

به منظور پیش تیمار بذر با امواج فراصوتی بذرهای سرخارگل طی ۵ مدت ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک (Elmasonic, Germany) با قدرت ۵۰ وات (E)، گردید و سپس به منظور آزمون جوانه زنی در انکوباتور در دمای ۲۵°C (T) قرار گرفت. (E<sub>0</sub>T<sub>1</sub>, E<sub>10</sub>T<sub>1</sub>, E<sub>15</sub>T<sub>1</sub>, E<sub>20</sub>T<sub>1</sub>, E<sub>25</sub>T<sub>1</sub>). پنج تیمار نیز پس از اعمال تیمار با امواج فراصوتی در انکوباتور در دمای متناوب ۱۶ ساعت، ۲۵°C و ۸ ساعت، ۸°C قرار داده شد (E<sub>0</sub>T<sub>2</sub>, E<sub>10</sub>T<sub>2</sub>, E<sub>15</sub>T<sub>2</sub>, E<sub>20</sub>T<sub>2</sub>, E<sub>25</sub>T<sub>2</sub>).

به منظور اعمال پیش تیمار سرمایی، بذر با ابتدا در شرایط آبنوشی قرار گرفتند و سپس در شرایطی که آب جذب کرده اند در دمای ۴°C به مدت ۱، ۲ و ۳ هفته نگهداری شدند. پس اتمام زمان سرمادهی (S) در انکوباتور در دمای ۲۵°C به منظور آزمون جوانه زنی قرار گرفتند (S<sub>1</sub>T<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>T<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>T<sub>1</sub>).

۳۰ عدد بذر سرخارگل درون هر پتری دیش قرار داده شد، جوانه زنی هر ۱۲ ساعت بررسی گردید. معیار جوانه زنی خروج ریشه چه به اندازه ۲ میلی متر یا بیشتر بود. در کلیه تیمارهای دمایی، برای هر تکرار منحنی پیشرفت جوانه زنی در مقابل زمان (ساعت) ترسیم و زمان لازم برای ۵۰ درصد (D<sub>50</sub>) جوانه زنی از طریق درون یابی برآورد گردید. همچنین معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه زنی (1/D<sub>50</sub>) به عنوان سرعت جوانه زنی در نظر گرفته شد (۷۳). درصد جوانه زنی با تقسیم تعداد بذرهای جوانه زده به کل تعداد بذرهای مورد استفاده ضرب در صد به دست آمد. محاسبات مورد نیاز با استفاده از برنامه جرمین (Germin) انجام شد (۲۰).

در این آزمایش خصوصیات جوانه زنی، میزان و کارایی استفاده از ذخایر، کسر ذخایر پویا شده بذر، طول گیاهچه، وزن خشک گیاهچه نیز محاسبه گردید. برای این منظور با استفاده از وزن اولیه لپه ها و وزن باقیمانده و همچنین استفاده از روابط زیر رشد هتروتروفیک گیاهچه بررسی گردید (۱۹۸).

$$(۱) \quad \text{وزن خشک باقیمانده بذر} - \text{وزن خشک اولیه بذر} = \text{مقدار استفاده از ذخایر بذر}$$

$$(۲) \quad \text{کارایی استفاده از ذخایر بذر} = \frac{\text{وزن خشک گیاهچه}}{\text{مقدار استفاده از ذخایر بذر}}$$

$$(۳) \quad \text{کسر ذخایر مصرف شده بذر} = \frac{\text{وزن خشک اولیه بذر}}{\text{کارایی استفاده از ذخایر بذر}}$$

شاخص قدرت بذر نیز از حاصلضرب درصد جوانه‌زنی نهایی در طول گیاهچه (طول ریشه‌چه + طول

ساقه‌چه) به دست آمد که در این رابطه طول گیاهچه بر حسب سانتی‌متر می‌باشد (۳۷):

$$(۴) \quad \text{درصد جوانه زنی} \times \text{طول گیاهچه} = \text{شاخص قدرت بذر}$$

### ۳-۱-۳ طرح آزمایشی سوم

به منظور بررسی اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی بذر استویا ، بذرهای استویا در ۵ مدت ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه تیمار شدند و سپس آزمون جوانه‌زنی انجام و حداکثر درصد جوانه‌زنی، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی، قند کل و پروتئین محلول آن اندازه‌گیری شد.

داده‌های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و مقایسه‌ی میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

## ۳-۲ مواد و روش ارزیابی مدل‌های رگرسیونی

### ۳-۲-۱ مواد و روش

این تحقیق در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه زراعت دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، بر بذر سرخارگل انجام شد آزمایش حاضر در قالب فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل دما در شش سطح ( $15^{\circ}\text{C}$ ،  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $25^{\circ}\text{C}$ ،  $30^{\circ}\text{C}$ ،  $35^{\circ}\text{C}$  و  $40^{\circ}\text{C}$ ) و پتانسیل آب در چهار سطح (۰، -۳، -۶ و -۹ بار)، با سه تکرار انجام شد. پتانسیل‌های آب با فرمول میچل (۱۹۷۳) و با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG 6000) تهیه و برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد (۱۶۲).

برای هر تیمار ۳۰ عدد بذر سرخارگل جدا شد و بعد از ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد، بر روی یک لایه کاغذ صافی، داخل پتری‌دیش قرار داده شد. کاغذ صافی مورد استفاده برای هر تیمار، قبلاً توسط محلول‌های پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰، با پتانسیل‌های ۰، -۳، -۶ و -۹ بار خیسانده شده بودند. برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. پتری‌دیش‌ها در دماهای  $15^{\circ}\text{C}$ ،  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $25^{\circ}\text{C}$ ،  $30^{\circ}\text{C}$  و  $35^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. شمارش بذرهای جوانه زده روزی یک بار صورت گرفت. در هر بار بذرهای جوانه زده از محیط جوانه‌زنی خارج شدند. معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیشتر بود. در طول آزمایش در صورت نیاز، به تیمارها آب مقطر (شاهد) یا محلول‌های تهیه شده اضافه شد. در کلیه تیمارهای دمایی، برای هر تکرار منحنی پیشرفت جوانه‌زنی در مقابل زمان (ساعت) ترسیم و زمان لازم برای ۵۰ درصد ( $D_{50}$ ) جوانه‌زنی از طریق درون‌یابی برآورد گردید. همچنین معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی ( $1/D_{50}$ ) به عنوان سرعت جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (۴۰). درصد جوانه‌زنی با تقسیم تعداد بذرهای جوانه زده به کل تعداد بذرهای مورد استفاده ضرب در صد به دست آمد. محاسبات مورد نیاز با استفاده از برنامه جرمین (Germin) انجام شد (۲۰).

برای کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی به دما و تعیین دماهای کاردینال و نیز تعداد ساعت بیولوژیک (تعداد ساعت مورد نیاز برای جوانه‌زنی تحت شرایط دمایی مطلوب) مورد نیاز برای جوانه‌زنی از مدل زیر استفاده شد (۱۹۹):

$$1/g = f(T)/f_0$$

که در آن  $1/g$  سرعت جوانه‌زنی،  $(T)$  تابع دما و  $f_0$  تعداد ساعت بیولوژیک مورد نیاز برای جوانه‌زنی می‌باشد.

در این مطالعه سه تابع دمایی برای توصیف تغییرات سرعت جوانه‌زنی در مقابل دما مقایسه شدند، که عبارتند از:

۱- تابع بتای اصلی<sup>۱</sup> با علامت اختصاری (B) که معادله آن به صورت زیر است (۱۹۸):

$$f(T) = [(T-T_b / T_o-T_b) * (T_c-T / T_c-T_b)^{(T_c-T_o / T_o-T_b)}]^\alpha$$

۲- تابع دندان مانند<sup>۲</sup> با علامت اختصاری (D) که معادله آن به صورت زیر است (۱۹۹):

$$f(T) = (T-T_b) / (T_{o1}-T_b) \quad \text{اگر} \quad T_b < T \leq T_{o1}$$

$$f(T) = (T_c-T) / (T_c-T_{o2}) \quad \text{اگر} \quad T_{o2} < T \leq T_c$$

$$f(T) = 1 \quad \text{اگر} \quad T_{o1} < T \leq T_{o2}$$

$$f(T) = 0 \quad \text{اگر} \quad T \leq T_b \text{ or } T \geq T_c$$

۳- تابع دو تکه‌ای<sup>۳</sup> با علامت اختصاری (S) که معادله آن به صورت زیر است (۱۹۹):

$$f(T) = (T-T_b) / (T_o-T_b) \quad \text{اگر} \quad T_b < T \leq T_o$$

$$f(T) = [1 - (T-T_o) / (T_c-T_o)] \quad \text{اگر} \quad T_o < T \leq T_c$$

$$f(T) = 0 \quad \text{اگر} \quad T \leq T_b \text{ or } T \geq T_c$$

<sup>1</sup> Beta Original

<sup>3</sup> Dent-like

<sup>3</sup> Segmented

در این توابع  $T_b$  دمای پایه،  $T_{o1}$  دمای مطلوب تحتانی،  $T_{o2}$  دمای مطلوب فوقانی،  $T_o$  دمای مطلوب،  $T_c$  دمای سقف،  $f_0$  و  $a$  ضریب ثابت و  $T$  دمای متوسط روزانه (دمای مورد آزمایش) می‌باشد.

تخمین پارامترهای هر مدل با روش مطلوب‌سازی تکراری به کمک رویه PROCNLIN نرم‌افزار SAS صورت گرفت. در روش مطلوب‌سازی تکراری با هر بار وارد کردن مقادیر اولیه پارامترها، مقادیر نهایی آن با روش کمترین توان‌های دوم تخمین زده می‌شود. تغییر مقادیر اولیه تا زمانی انجام می‌گیرد که بهترین برآورد از پارامترها به دست آید. بهترین برآورد پارامترهای مدل بر اساس خطای معیار (SE) کمتر پارامترها و جذر میانگین مربعات انحراف (RMSE) کمتر رگرسیون مشخص می‌شود (۴). برای انتخاب مدل برتر از میان مدل‌های مورد استفاده، از جذر میانگین مربعات انحرافات (RMSE) برای زمان جوانه‌زنی، ضریب تبیین ( $R^2$ )، ضریب همبستگی ( $r$ )، ضرایب رگرسیون ساده خطی ( $a$  و  $b$ ) در رابطه زمان (ساعت) تا جوانه‌زنی مشاهده شده و پیش بینی شده استفاده شد. هر چقدر ضریب تبیین ( $R^2$ ) مدل استفاده شده بالاتر باشد نشان دهنده این است که مدل درصد تغییرات سرعت جوانه‌زنی را بیشتر توجیه می‌کند. ضرایب  $a$  و  $b$  به ترتیب نشان دهنده میزان انحراف خط رگرسیون از مبدأ مختصات و میزان اریب خط رگرسیون از خط ۱:۱ است. معنی‌داری ضریب  $a$  توسط نرم‌افزار SAS<sup>۴</sup> و ضریب  $b$  با تعیین حدود اطمینان بررسی شد. هر چه پراکنش نقاط در اطراف خط یک به یک کمتر باشد نشانه کارایی بالاتر مدل است. با توجه به این معیارها مدل برتر، به منظور توصیف سرعت جوانه‌زنی نسبت به دما در پتانسیل‌های مختلف آب، برای تعیین دماهای کاردینال جوانه‌زنی استفاده می‌شود. آنالیز درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر دما و پتانسیل آب با استفاده از برنامه SAS، انجام شد.

---

<sup>4</sup> Statistical Analysis System

### ۳-۳- مواد و روش اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر مواد فنلی در

#### استویا و سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای

#### ۳-۳-۱ معرفی سرخارگل

در این مطالعه، بذر گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. مبدأ این گیاه در شمال آمریکا بوده، از آنجایی که این گیاه بومی ایران نمی‌باشد کاشت آن برای اولین بار توسط کوره‌پز به صورت آزمایشی در سال ۱۳۸۰ انجام شد (۳۰). هدایت الکتریکی کمتر از  $1\text{mScm}^{-1}$  برای این گیاه مطلوب می‌باشد و pH بین ۸-۵/۹ را تحمل می‌کند. این گیاه به نور فراوان نیاز دارد و به سرما مقاوم بوده و تا دمای منفی  $10^{\circ}\text{C}$  را تحمل می‌کند (۸۱). این گیاه برای اولین بار برای در منطقه‌ی بسطام کشت گردید.

#### ۳-۳-۲ مشخصات جغرافیایی و اقلیمی محل اجرای آزمایش سرخارگل

این آزمایش در مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود (واقع در بسطام) با مختصات جغرافیایی طول شمالی  $54/58$  درجه و عرض شمالی  $36/35$  درجه با ارتفاع  $1420$  متری از سطح دریا، در سال زراعی  $1395-1394$  انجام گرفت. شهرستان بسطام دارای میانگین دمای متوسط سالانه  $14^{\circ}\text{C}$ ، میانگین دراز مدت بارندگی سالانه  $180$  میلی‌متر و رطوبت نسبی  $63\%$  می‌باشد. شهرستان بسطام دارای آب و هوای معتدل سرد و مرطوب کوهستانی می‌باشد.

#### ۳-۳-۳ مشخصات خاک محل مورد آزمایش سرخارگل

قبل از انجام آزمایش از عمق  $0-30$  سانتی‌متری خاک مزرعه نمونه‌برداری شده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در آزمایشگاه تعیین گردید. بر این اساس خاک مزرعه دارای بافت لوم‌سیلتی، کربن آلی



خاک ۰/۷۶ ، فسفر قابل جذب ppm ۱۵/۵۴ ، پتاسیم قابل جذب ppm ۲۵۰ ، نیتروژن کل ۰/۰۶۰ درصد،  
EC= ۱/۵ و pH= ۷/۲ دسی‌زیمنس بر متر بود.

### ۳-۳-۴ اجرای طرح آزمایشی سرخارگل

آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک با چهار غلظت (۰، ۵، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک با سه غلظت (۰، ۵/۰ و ۱ میلی‌مولار) و محلول‌پاشی هر دوی آن‌ها با فاصله زمانی ۱۰ روز از زمان ورود به فاز زایشی (ظهور غنچه) شروع و در سه نوبت تکرار گردید. به لحاظ اینکه استفاده‌ی همزمان دو هورمون با هم به دلیل احتمال وجود اثر آنتاگونیستی ممکن نبود با فاصله‌ی زمانی ۱۰ روز محلول‌پاشی آن‌ها صورت گرفت. شایان ذکر است که علت عدم اجرای آزمایش به صورت فاکتوریل، یافتن بهترین ترکیب تیماری اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بود نه تحلیل ماهیت برهمکنش آنها؛ در این شرایط می‌توان ترکیب فاکتورها را به عنوان یک سطح تیمار مد نظر قرار داد (۲۲). تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، 5 Ja-0.5 Sa (پنج میکرومولار اسید جاسمونیک-نیم‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، 5 Ja-1Sa (پنج میکرومولار اسید جاسمونیک-یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، 5 Ja (پنج میکرومولار اسید جاسمونیک)، 20 Ja-0.5 Sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک-نیم‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، 20 Ja-1Sa (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک-یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، 20 Ja (۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک)، 50 Ja-0.5 Sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک-نیم‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، 50 Ja-1 Sa (۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک-یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، 50 Ja (۵۰ میکرو-مولار اسید جاسمونیک)، 0.5Sa (نیم‌میلی‌مولار اسید سالیسیلیک)، و 1Sa (یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک) بود.

### ۳-۳-۵ مراقبت زراعی سرخارگل

به دلیل جوانه زنی نامناسب بذر سرخارگل از بهترین مدت پیش تیمار با امواج فراصوتی یعنی ۱۵ دقیقه برای بهبود جوانه زنی استفاده شد و بذرهای سرخارگل نیمه سوم اسفند در خزانه کشت شد. ۱۵ خرداد انتقال نشاها به زمین اصلی صورت گرفت. عملیات تهیه‌ی زمین شامل یک شخم عمیق، دو دیسک عمود بر هم و ایجاد جوی و پشته‌ها بود، فاصله‌ی پشته‌ها از هم ۶۰ سانتی‌متر بود. هر واحد آزمایشی به ابعاد ۳×۳ متر دارای پنج خط کاشت، به فاصله ردیف ۶۰ سانتی‌متر (فاصله‌ی پشته‌ها)، فاصله‌ی بوته‌ها ۳۰ سانتی‌متر و تراکم حدود ۶ بوته در واحد سطح کشت شد. برای تغذیه گیاه از ورمی کمپوست به میزان چهار تن در هکتار استفاده شد. آبیاری مزرعه هر ۷ روز یک بار صورت می‌گرفت. به دلیل کند بودن رشد سرخارگل در سال اول بعد از نشاء، کود شیمیایی نیتروژن به صورت سرک در سه مرحله (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) بعد از نشاء (در مرحله‌ی ۴ برگی، پنجه‌زنی و آغاز گلدهی) افزوده شد.

### ۳-۳-۶ اعمال تیمار و نمونه‌برداری سرخارگل

محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک از زمان ورود به فاز زایشی (ظهور غنچه) شروع و در سه نوبت تکرار گردید. برای محلول‌سازی اسید جاسمونیک (با سمپلر) و اسید سالیسیلیک پس از وزن کردن در دو میلی‌لیتر اتانول حل شد و سپس با آب مقطر به حجم مورد نظر رسانیده شد. در گیاه شاهد نیز محلول‌پاشی با آب مقطر به همراه دو میلی‌لیتر الکل صورت گرفت. سپس یک هفته بعد از پایان محلول‌پاشی آخر که مقارن با گلدهی کامل بود نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی صورت گرفت. نمونه‌برداری از آخرین برگ کاملاً توسعه یافته فوقانی صورت گرفت. برای تعیین عملکرد گل بعد از پایان محلول‌پاشی برداشت گل در سه نوبت صورت گرفت و بعد از خشک کردن در سایه، وزن خشک گل برای تعیین عملکرد در هکتار استفاده گردید. برای تعیین وزن خشک برگ، همزمان با برداشت مرحله‌ی آخر گل برداشت گردید و پس از خشک شدن در سایه توزین شدند.

### ۳-۳-۷ معرفی استویا

در این مطالعه، نشا گیاه استویا از شرکت گلزاران شمال تهیه شد. استویا گیاهی علفی، چند ساله از خانوادهی *Astraceae*، بومی شمال کشور پاراگوئه می‌باشد (۴۷). استویا به سرما حساس بوده و برای رشد مطلوب استویا دمای °C ۲۴-۲۰ لازم می‌باشد. از نظر نیاز آبی، استویا به میزان قابل توجهی آب نیاز دارد، نواحی با آب و هوای نیمه مرطوب و نیمه گرمسیری به ترتیب با دامنه بارندگی ۱۸۰۰-۱۵۰۰ میلی‌متر و دامنه دمایی °C ۴۳-۱۰ رشد می‌یابد (۴۷ و ۱۶۸).

### ۳-۳-۸ مشخصات جغرافیایی و اقلیمی محل اجرای آزمایش استویا

این آزمایش در یکی از باغ‌های شهرستان محمودآباد با مشخصات جغرافیایی طول شمالی ۵۲/۱۶ درجه و عرض شمالی ۳۶/۳۸ درجه با ارتفاع ۲۰ متری از سطح دریا، در سال زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۴ انجام گرفت. شهرستان محمودآباد دارای میانگین دمای متوسط سالانه °C ۱۶/۶، میانگین دراز مدت بارندگی سالانه ۴۰۸ میلی‌متر و رطوبت نسبی بالا می‌باشد. شهرستان محمودآباد دارای آب و هوای گرم و معتدل می‌باشد.

### ۳-۳-۹ مشخصات خاک محل مورد آزمایش استویا

قبل از انجام آزمایش از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه نمونه‌برداری شده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در آزمایشگاه تعیین گردید. بر این اساس خاک مزرعه دارای بافت خاک سیلتی‌رسی، کربن آلی خاک ۲/۱۶٪، فسفر قابل جذب ppm ۱۳/۵۴، پتاسیم قابل جذب ppm ۲۰۰، نیتروژن کل ۰/۱۲ درصد، pH= ۷ و EC= ۰/۷ دسی‌زیمنس بر متر بود.

### ۳-۳-۱۰ مراقبت زراعی استویا

عملیات تهیهی زمین شامل یک شخم عمیق، دو دیسک عمود بر هم و کشت به صورت ردیفی انجام شد، فاصله‌ی ردیف‌ها و بوته‌ها از هم ۳۰ سانتی‌متر بود. هر واحد آزمایشی به ابعاد ۲×۳ متر دارای ۱۰

خط کاشت و تراکم ۱۱ بوته در متر مربع بود. نشاها ۱۵ اردیبهشت به زمین اصلی منتقل شد و آبیاری هفته‌ای یکبار صورت می‌گرفت.

### ۳-۳-۱۱ اجرای طرح آزمایشی استویا

آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک با چهار غلظت (۰، ۵، ۲۰ و ۵۰ میکرومولار)، اسید سالیسیلیک با سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و محلول‌پاشی هر دوی آنها با فاصله زمانی ۱۰ روز از زمان استقرار نشاها، شروع و در سه نوبت تکرار گردید. علت عدم اجرای آزمایش به صورت فاکتوریل، یافتن بهترین ترکیب تیماری اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بود نه تحلیل ماهیت برهمکنش آنها.

### ۳-۳-۱۲ اعمال تیمار و نمونه‌برداری استویا

محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک از بعد از استقرار گیاه و در مرحله‌ی رویشی شروع و در سه نوبت تکرار گردید. محلول‌پاشی تیمارهای ترکیبی با فاصله زمانی ۱۰ روز انجام شد. سپس یک هفته بعد از پایان محلول‌پاشی آخر نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی و عملکرد صورت گرفت. نمونه‌برداری از آخرین برگ کاملاً توسعه یافته فوقانی صورت گرفت. بعد از خشک کردن در سایه، وزن خشک برگ برای تعیین عملکرد در هکتار استفاده گردید.

### ۳-۳-۱۳ استخراج عصاره آنزیم NADPH اکسیداز و SOD

استخراج عصاره آنزیم NADPH اکسیداز و سوپر اکسید دسموتاز به روش (۷۵) انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت برگ با ۲ میلی‌لیتر از بافر استخراج شامل تریس ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ساکارز ۲۵۰ میلی‌مولار، تریتون X-100 نیم درصد، بتامرکاپتواتانول ۱۰ میلی‌مولار و PMSF

یک میلی مولار با  $\text{pH}=8$  در هاون چینی سرد هموزن شد. سپس با سرعت  $14000$  دور در دقیقه، دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و مدت  $20$  دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای سنجش آنزیم‌ها استفاده شد.

### ۳-۳-۱۴ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز از روش (۲۰۷) انجام شد. مخلوط واکنش به حجم یک میلی لیتر شامل بافر تریس  $50$  میلی مولار با  $\text{pH}=8$ ، NBT و NADPH  $0.1$  میلی مولار و  $30$  میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در طول موج  $530$  نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, chine) و بر اساس تولید رنگ مونوفورمازان از احیای NBT بوسیله‌ی رادیکال-های سوپراکسید اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی برای ایجاد مونوفورمازان  $12/8 \text{ m M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  بود. برای تأیید رنگ ایجاد شده توسط NADPH اکسیداز از  $50$  واحد سوپراکسید دسموتاز استفاده شد که این مقدار سوپراکسید دسموتاز سبب توقف فعالیت NADPH اکسیداز در مخلوط واکنش گردید.

### ۳-۳-۱۵ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD)

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش (۵۸) انجام شد. در این روش از ریبوفلاوین و متیونین در حضور نور جهت تولید رادیکال سوپراکسید استفاده شد. رادیکال سوپراکسید سبب احیای NBT و ایجاد مونوفورمازان (رنگ بنفش) می‌شود. کاهش ایجاد مونوفورمازان در مخلوط واکنش از طریق مصرف رادیکال سوپراکسید توسط آنزیم SOD در طول موج  $560$  نانومتر بر اساس ممانعت از تولید مونوفورمازان (احیای NBT) در مدت زمان  $10$  دقیقه اندازه‌گیری شد.

### ۳-۳-۱۶ استخراج پراکسید هیدروژن

عمل استخراج بر اساس روش (۱۲۹) انجام شد. مقدار  $0.105$  گرم از بافت برگ گیاه سرخارگل در  $1/5$  میلی لیتر بافر فسفات  $50$  میلی مولار با  $\text{pH}$  برابر  $6/5$  حاوی هیدروکسیل آمین  $1$  میلی مولار هموزن

گردید و بعد از آن با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴°C بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن استفاده شد.

### ۳-۳-۱۷ اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن با استفاده از رنگ‌سنجی انجام گردید (۱۲۹). از معرف تیتانیوم کلراید برای تشخیص غلظت پراکسید هیدروژن استفاده شد. برای تعیین غلظت پراکسید هیدروژن مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر عصاره را با ۴۰۰ میکرولیتر معرف ترکیب و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴°C بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. شدت رنگ وابسته به تشکیل کمپلکس تیتانیوم-پراکسید هیدروژن بوده که بوسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از روی جذب نور بدست آمده بر اساس ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر  $0.28 \mu \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  برای کمپلکس تیتانیوم-پراکسید هیدروژن، مقدار پراکسید هیدروژن محاسبه گردید.

### ۳-۳-۱۸ استخراج و اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید

استخراج و اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید به روش (۱۲۰) انجام شد. در این روش، ۰/۱ گرم بافت برگ (از قسمت فوقانی) با ۴ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد در هاون چینی هموژنیزه گردید. عصاره هموژن شده به لوله فالكون منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۰°C سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از فاز بالایی (شفاف) از این عصاره با ۴ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی TBA ۰/۲۵ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب‌جوش قرار گرفت. بلافاصله پس از این مرحله لوله‌های فالكون به مدت ۱۵ دقیقه در یک ظرف یخ قرار داده شد. سپس میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج‌های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. محلول بلانک حاوی ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد بود که با ۲ میلی‌لیتر معرف TBA ۰/۲۵ درصد مخلوط شده بود و تمامی تیمارها با محلول بلانک سنجیده شد. میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس مقدار مالون‌دی‌آلدید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$LP \text{ (nmol. ml}^{-1}\text{)} = \frac{[(A_{532}-A_{600})-(A_{440}-A_{600})]}{157000}10^6$$

که MDA جذب مولی ساکارز در غلظت‌های ۱۰-۱ میلی مولار در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر است که به

ترتیب ۸/۴ و ۱۴۷ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰۵۷۱ می‌باشد (۹۲).

استخراج عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز:

استخراج به روش (۱۳۳) انجام شد.

**سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز و کاتالاز بر اساس (۷۷) همراه با تغییراتی انجام شد؛ سنجش**

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس روش (۱۳۳) همراه با تغییراتی انجام شد.

### ۳-۳-۱۹ استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای استخراج عصاره آنزیم آسکوربات پراکسیداز از بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار با ۵۰ میلی مولار با

pH = ۷ بر طبق روش (۱۷۲) استفاده شد. مقدار ۰/۰۵ گرم بافت برگ با ۲ میلی لیتر بافر فسفات در

هاون چینی سرد هموژن گردید. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه، دمای °C ۴ و ۱۴۰۰۰۰ دور در دقیقه

سانتریفیوژ شد. از فاز شفاف رویی برای اندازه‌گیری آنزیم استفاده گردید.

### ۳-۳-۲۰ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

جهت تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش به حجم ۲ میلی لیتر شامل ۱/۷

میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH = ۷، عصاره (۱۰۰ میکرولیتر)، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی -

مولار و (۵۰ میکرولیتر)، EDTA ۰/۱ میلی مولار ۵۰ میکرولیتر و آب اکسیژنه ۱/۲ میلی مولار (۱۰۰

میکرولیتر) بود، محلول بلانک فاقد آب اکسیژنه بوده و با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش،

فعالیت آنزیمی شروع شد. ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز (ε) برابر با  $2/8 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  می‌باشد.

برای محاسبه‌ی فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در ۱ دقیقه‌ی اول استفاده شد.

استخراج عصاره‌ی آنزیم‌های گلوکاتایون ردوکتاز، پراکسیداز و گلوکاتایون s-ترانسفراز از روش (۷۳) انجام شد؛ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون s-ترانسفراز از روش (۷۴) انجام شد؛ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز از روش (۷۳) انجام شد.

### ۳-۳-۲۱ اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز

مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل شامل ۸۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۵ (۸۷۰ میکرولیتر)، گلوکاتایون احیا شده (GSH) ۳/۶ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر)، پراکسید هیدروژن (۵۰ میکرولیتر) و عصاره بود (۳۰ میکرولیتر) بود. افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر  $6/22 \text{ m M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. از فعالیت آنزیم در ۱ دقیقه اول برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید.

### ۳-۳-۲۲ استخراج و اندازه‌گیری آنزیم PAL

۰/۰۵ گرم از بافت تر در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار pH=۸) هموزن گردید. سپس هموزن در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ، سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم PAL، به ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر فنیل-آلانین ۰/۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم با اسیدیته ۸ و ۶۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  که اوج فعالیت PAL است قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از HCl ۶ مولار برای غیرفعال کردن PAL به مخلوط اضافه شد. شست و شوی نمونه با ۳ میلی‌لیتر اتیل استات انجام شد. نمونه در جریان هوا تبخیر، به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه شد. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری مقدار



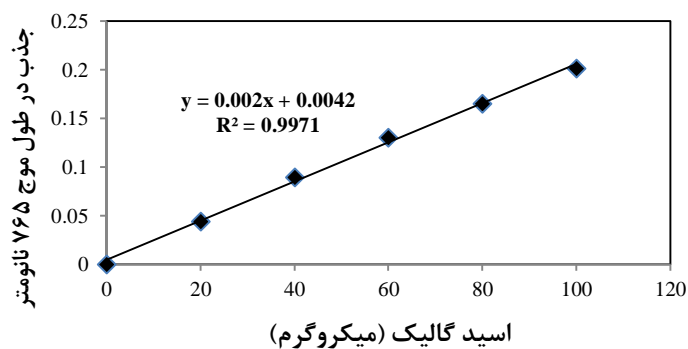
جذب طول موج ۲۹۰ نانومتر و به کمک استاندارد اسید سینامیک تعیین شد. یک واحد از PAL برابر با یک میکروگرم از اسید سینامیک تولید شده در ساعت است (۱۷۴).

### ۳-۳-۲۳ استخراج و اندازه‌گیری فنل کل

۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ و گلبرگ (وزن خشک) با ۲۴ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ در سه مرحله هموژن گردید. هموژن حاصل بمدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس در دمایی پایین‌تر از ۵۰°C قرار گرفت تا متانول تبخیر گردد و حجم عصاره به ۴/۸ میلی‌لیتر رسانده شد. آنگاه به منظور حذف ترکیبات رنگی به عصاره تغلیظ شده به نسبت یک به پنج کلروفرم اضافه گردید. بعد از ورتکس کردن به مدت ۱ دقیقه رها شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. کلروفرم که جرم مولکولی بیشتری نسبت به عصاره دارد در زیر و عصاره‌ی شفاف در رو قرار می‌گیرد، از فاز رویی برای اندازه‌گیری فنل کل استفاده گردید. اندازه‌گیری میزان فنل کل با روش (۱۰) صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به همراه ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکاتیو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰) درون لوله‌ی فالكون ریخته شد و در بن‌ماری با دمای ۲۲°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس به آن ۳ میلی‌لیتر محلول بیکربنات سدیم ۶٪ افزوده و مجدداً در بن‌ماری با دمای ۲۲°C به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۹۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید. لازم به ذکر است که بلانک نیز مانند نمونه تهیه گردید با این تفاوت که به جای عصاره، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر به لوله‌ی فالكون اضافه گردید. غلظت فنل کل برگ با استفاده از منحنی استاندارد که با استفاده از اسید کلروژنیک رسم شده بود تعیین گردید ( $y=3.0619 \times 0.0363$ ,  $R^2=0.999$ ). و میزان فنل کل گلبرگ با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک (جدول و شکل ۳-۳-۱) تعیین گردید.

### ۳-۳-۱- جدول طرز تهیه منحنی استاندارد فنل کل

شماره	اسید گالیک	آب مقطر	معرف فولین	کربنات	جذب در طول موج
لوله آزمایش	(ul)	(ul)	(ul)	سدیم	nm۷۶۵
				% ۷	
۱	۰	۱۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۰
۲	۲۰	۸۰	۵۰۰	۵۰۰	۰/۰۴۴
۳	۴۰	۶۰	۵۰۰	۵۰۰	۰/۰۸۹
۴	۶۰	۴۰	۵۰۰	۵۰۰	۰/۱۳۰
۵	۸۰	۲۰	۵۰۰	۵۰۰	۰/۱۶۵
	۱۰۰	۰	۵۰۰	۵۰۰	۰/۲۰۱



شکل ۳-۳-۱- منحنی استاندارد فنل کل.

### ۳-۳-۲۴- سنجش میزان فلاونوئیدها

مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ با ۳ میلی لیتر اتانول اسیدی به نسبت حجمی ۹۹ میلی لیتر اتانول و ۱ سی سی اسید استیک گلایسال هموزن گردیده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه ی سانتی گراد قرار گرفت، سپس شدت جذب در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید (۱۴۱).

### ۳-۳-۲۵ سنجش آنتوسیانین

سنجش میزان آنتوسیانین با استفاده از روش (۱۶۵) انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر گلبرگ با ۴ میلی لیتر اسید کلریدریک در متانول یک درصد (یک میلی لیتر اسید کلریدریک و ۹۹ میلی لیتر متانول) هموژن گردید و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. جذب نور در فاز رویی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۶۵۷ و ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

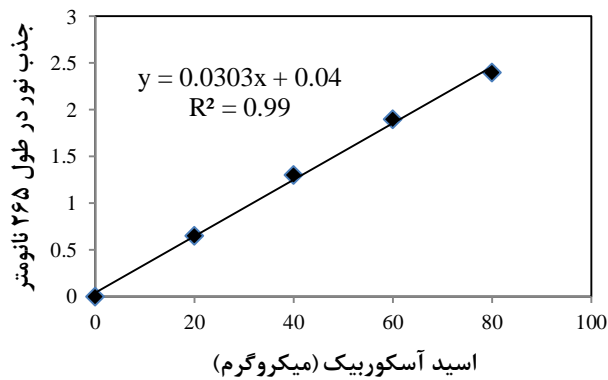
$$A=A530-(0.25 A657)$$

### ۳-۳-۲۶ سنجش میزان اسید آسکوربیک

استخراج اسید آسکوربیک با استفاده از روش (۱۰۱) انجام شد. مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر گلبرگ در متافسفریک اسید ۵ درصد در هاون چینی سرد هموژن شد، و بعد در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. فاز رویی عصاره برای اندازه گیری گیری مقدار اسید آسکوربیک استفاده شد. مخلوط واکنش برای اندازه گیری به حجم سه میلی لیتر شامل ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی، ۲/۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH= ۵/۶، ۵۰ میکرولیتر متافسفریک اسید ۵ درصد اضافه شد و بلافاصله جذب نور در طول موج ۲۶۵ نانومتر قرائت شد، سپس غلظت اسید آسکوربیک از طریق منحنی استاندارد ی که با استفاده از اسید آسکوربیک، متافسفریک اسید و بافر فسفات ۰/۲ مولار تهیه شده بود تعیین گردید ( $y=0.0266x+0.0392$ ,  $R^2=0.9978$ ).

### ۳-۳-۲- طرز تهیه‌ی منحنی استاندارد اسید آسکوربیک

شماره	اسید آسکوربیک ( $\mu\text{l}$ )	متاسفریک اسید ۵٪ ( $\mu\text{l}$ )	یافر فسفات سدیم (ml)	جذب نور در طول موج ۲۶۵ nm
۱	۰	۱۰۰	۲/۹	۰
۲	۲۰	۸۰	۲/۹	۰/۶۵
۳	۴۰	۶۰	۲/۹	۰/۱۳
۴	۶۰	۴۰	۲/۹	۰/۱۹
۵	۸۰	۲۰	۲/۹	۰/۲۴



شکل ۳-۳-۲- منحنی استاندارد اسید آسکوربیک

### ۳-۳-۲۷- سنجش قندهای محلول

#### ۳-۳-۲۷-۱- معرف آنترون

برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف آنترون، ۷۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد با ۲۴ میلی‌لیتر

آب مقطر رقیق شده و سپس ۱۵۰ میلی‌گرم آنترون در آن حل گردید و در ظرف کهربایی نگهداری شد.

### ۳-۲۷-۲ معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید

برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید، ۱ گرم هیدروکسید سدیم در آب مقطر حل شده و سپس ۰/۰۵ گرم سولفیت سدیم ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) به آن اضافه شد. در بشر دیگر، ۱ گرم دی‌نیتروسالیسیلیک اسید را با ۰/۰۲ گرم فنل در آب حل کرده و به محلول اول اضافه شد. مخلوط حاصل با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

**استخراج قندها:** برای استخراج قندهای محلول از روش (۱۷۵) استفاده شد. برای این منظور ۰/۰۵ گرم از بافت تر بخش‌های هوایی گیاه را با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در هاون چینی هموژن کرده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای  $70^\circ\text{C}$  قرار داده شد. عصاره الکلی حاوی قندهای محلول جدا شده در لوله‌های فالكون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و قسمت پایینی همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد دوباره برای تکرار عصاره‌گیری به بن‌ماری منتقل گردید. عمل استخراج با اتانول ۴ بار دیگر تکرار شد. عصاره‌ی الکلی هر مرحله بعد از بن‌ماری به درون لوله‌ی فالكون ۵۰ میلی‌لیتری اضافه می‌شد. بعد از استخراج به منظور تبخیر الکل، عصاره به دست آمده در دمای  $70^\circ\text{C}$  قرار گرفت و در نهایت حجم آن به یک پنجم اولیه رسید. برای حذف کلروفیل، عصاره به دست آمده به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط گردید و بعد از ورتکس کردن به مدت ۵ دقیقه به حال سکون رها شد. کلروفرم به دلیل داشتن جرم مولکولی بیشتر در قسمت پایین و قسمت شفاف بالایی جدا شده یا فاز بالایی عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول مورد استفاده قرار گرفت.

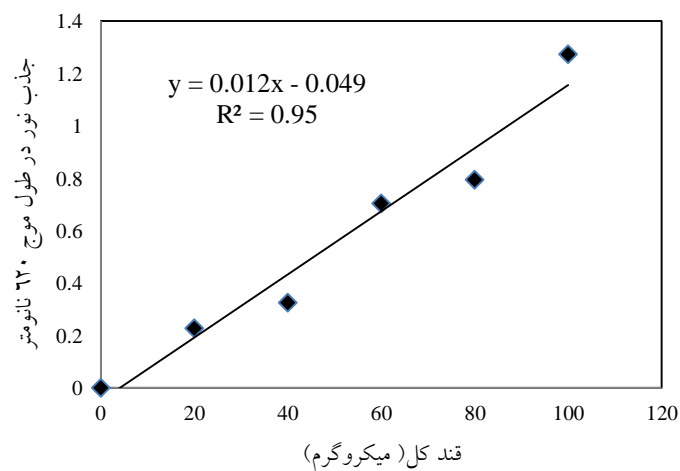
### ۳-۲۷-۳ تهیه نمودار استاندارد قند کل

برای تهیه نمودار استاندارد قند کل از محلول گلوگز با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. در لوله‌های آزمایش مقادیر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق که به ترتیب حاوی ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم گلوکز بود، اضافه گردید. در نهایت حجم محلول‌ها

با آب مقطر به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله آزمایشی که فاقد گلوکز بود به عنوان شاهد استفاده شد. سپس ۳ میلی لیتر معرف آنترون به هر یک از لوله های آزمایش اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. میزان جذب نور هر یک از نمونه ها پس از سرد شدن در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس مطابق جدول (۳-۳-۳) از روی مقادیر مختلف جذب نور به دست آمده در طول موج ۶۲۰ نانومتر به ازای مقادیر مختلف گلوکز نمودار استاندارد رسم گردید.

جدول ۳-۳-۳- طرز تهیه نمودار استاندارد قند کل.

شماره لوله آزمایش	مقدار محلول گلوکز (ul)	آب مقطر (ul)	معرف آنترون (ml)	جذب نور در طول موج ۶۲۰ nm
۱	۰	۲۰۰	۳	۰
۲	۲۰	۱۸۰	۳	۰/۲۲۷
۳	۴۰	۱۶۰	۳	۰/۳۲۵
۴	۶۰	۱۴۰	۳	۰/۷۰۳
۵	۸۰	۱۲۰	۳	۰/۷۹۴
۶	۱۰۰	۱۰۰	۳	۱/۲۷۳



شکل ۳-۳-۳- نمودار استاندارد قند کل

### ۳-۳-۲۸ اندازه‌گیری قند کل

برای اندازه‌گیری قند کل از روش (۱۵۷) استفاده شد. برای این کار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۹۵°C قرار گرفت. میزان جذب نور پس از سرد شدن در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد.

### ۳-۳-۲۹ اندازه‌گیری قندهای احیایی

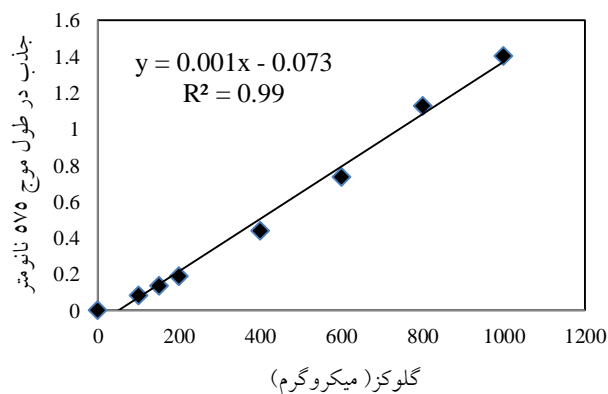
اندازه‌گیری قندهای احیایی براساس روش (۱۶۴) صورت گرفت. برای این کار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره تغلیظ شده حاوی قندهای محلول با ۱/۵ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۹۰ °C قرار گرفت. پس از آن بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به آن افزوده شده و پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نور در طول موج ۵۷۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

### ۳-۳-۲۹-۱ تهیه نمودار استاندارد قندهای احیایی

برای تهیه نمودار استاندارد، از محلول گلوکز با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. به هر یک از لوله‌های آزمایش، مقادیر ۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول گلوکز که به ترتیب حاوی ۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم گلوکز بودند، اضافه گردید. در نهایت حجم لوله‌های آزمایش با آب مقطر به ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به مخلوط حاصل ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۹۰ °C قرار گرفت. بلافاصله پس از آن ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به آن افزوده و پس از سرد شدن لوله‌ها جذب نور در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از داده‌های قرائت شده نمودار استاندارد قندهای احیایی رسم گردید (جدول ۳-۳-۴ و شکل ۳-۳-۴).

جدول ۳-۳-۴- طرز تهیه نمودار استاندارد قندهای احیایی.

شماره لوله آزمایش	مقدار محلول گلوکز (μl)	آب مقطر (μl)	معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (ml)	پتاسیم سدیم تارتارات (ml)	جذب نور در طول موج ۵۷۵ nm
۱	۰	۱۵۰۰	۱/۵	۰/۵	۰
۲	۱۰۰	۱۴۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۰۸۲
۳	۱۵۰	۱۳۵۰	۱/۵	۰/۵	۰/۱۳۵
۴	۲۰۰	۱۳۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۱۹۰
۵	۴۰۰	۱۱۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۴۳۹
۶	۶۰۰	۹۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۷۳۶
۷	۸۰۰	۷۰۰	۱/۵	۰/۵	۱/۱۲۷
۸	۱۰۰۰	۵۰۰	۱/۵	۰/۵	۱/۴۰۴



شکل ۳-۳-۴- نمودار استاندارد قندهای احیایی

### ۳-۳-۳- اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی

برای اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی از روش ارائه شده توسط هاندل (۱۱۴) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده با ۰/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در دمای °C ۱۰۰ قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها، ۳ میلی‌لیتر



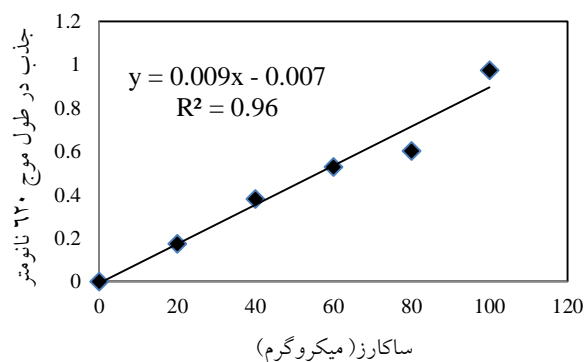
معرف آنترون به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای °C ۴۰ قرار گرفتند. سپس جذب نور هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد.

### ۳-۳-۱- تهیه نمودار استاندارد قندهای غیراحیایی

برای تهیه نمودار استاندارد از محلول ساکارز با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. به هر لوله آزمایش، مقادیر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پایه ساکارز که به ترتیب حاوی ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکروگرم ساکارز بودند، اضافه گردید. در نهایت حجم لوله‌های آزمایش با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله آزمایشی که فاقد ساکارز بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به مخلوط حاصل ۰/۱ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در دمای °C ۱۰۰ قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها، ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای °C ۴۰ قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نور در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت و نمودار استاندارد قندهای غیراحیایی رسم گردید. شکل و جدول ۳-۳-۵- چگونگی مراحل تهیه نمودار استاندارد را به طور خلاصه نشان می‌دهد.

جدول ۳-۳-۵- طرز تهیه نمودار استاندارد قندهای غیراحیایی

شماره لوله	مقدار محلول ساکارز (μl)	آب مقطر (μl)	هیدروکسید پتاسیم (۳۰ درصد) (ml)	معرف آنترون (ml)	جذب نور در طول موج ۶۲۰ nm
۱	۰	۱۰۰	۰/۱	۳	۰
۲	۲۰	۸۰	۰/۱	۳	۰/۱۷۳
۳	۴۰	۶۰	۰/۱	۳	۰/۳۸۱
۴	۶۰	۴۰	۰/۱	۳	۰/۵۲۸
۵	۸۰	۲۰	۰/۱	۳	۰/۶۰۲
۶	۱۰۰	۰	۰/۱	۳	۰/۹۷۶



شکل ۳-۳-۵- نمودار استاندارد قندهای غیر احیایی

### ۳-۳-۳۱ استخراج و اندازه‌گیری نشاسته

استخراج نشاسته با روش (۱۵۷) صورت گرفت. در این روش ۴۰ میلی‌گرم از بقایای بافتی به جا مانده از استخراج قندهای محلول را در میکروتیوب ریخته، ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و در یخ نگهداری گردید. بلافاصله به آن ۰/۲۶ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۵۲ درصد افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ نگهداری شد. پس از گذشت این مدت، ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به درون لوله آزمایش منتقل شد و در یخ نگهداری گردید. رسوبات باقی مانده نیز با ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱۳ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۵۲ درصد مجدداً استخراج و پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی آن به لوله اول منتقل شد و در نهایت حجم فاز محلول درون لوله آزمایش به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده شد و از آن برای اندازه‌گیری نشاسته استفاده شد.

برای اندازه‌گیری نشاسته از روش مک کریدی و همکاران (۱۵۷) استفاده شد (۱۵۷). در این روش، ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره حاوی نشاسته با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها جذب نور آنها در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری مقدار نشاسته از نمودار استاندارد قند کل استفاده شد.

### ۳-۳-۳ اندازه‌گیری کلروفیل

جهت سنجش این پارامتر استخراج از روش (۴۶) و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل از روش (۲) استفاده گردید. برای این منظور ۰/۲۵ گرم وزن تر برگ که از برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته فوقانی برداشت گردیده بود با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده و هموژنیزه گردید. آنگاه در داخل لوله سانتریفیوژ ریخته و به مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (شفاف) برداشته و در داخل لوله داخل بالون ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر ریخته شد. مواد ته لوله سانتریفیوژ مجدداً به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد دوباره ساییده و سپس سانتریفیوژ گشت. فاز بالایی شفاف به بالون ژوژه اضافه شد. این عمل تا خاکستری شدن بافت برگ و رسیدن بالون به حجم ۲۵ میلی‌لیتر ادامه یافت. سپس با اسپکتوفتومتر مدل S2000 UV/VIS در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد. میزان کلروفیل a و b و کارتنوئید با استفاده از فرمول‌های ۱، ۲ و ۳ محاسبه گردید. قبل از قرائت در این طول موج‌ها ابتدا با شاهد (استون ۸۰ درصد) صفر شد.

$$Chl_a = 12/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{645}) \times \frac{v}{1000 \times w} \quad [1]$$

$$Chl_b = 22/9 (A_{645}) - 4/68 (A_{663}) \times \frac{v}{1000 \times w} \quad [2]$$

$$C_{\text{(کارتنوئید)}} = 7/6(A_{480}) - 1/49(A_{510}) \times \frac{v}{1000 \times w} \quad [3]$$

حجم عصاره مصرف شده، W وزن نمونه و  $Chl_a$ ،  $Chl_b$  و C به ترتیب غلظت کلروفیل a، b و کارتنوئید می‌باشد.

### ۳-۳-۳ اندازه‌گیری نفوذپذیری غشاء

نفوذپذیری غشای برگ بوسیله‌ی هدایت الکتریکی از روش (۲۱۷) تعیین شد. برای این منظور ۰/۲ گرم وزن تر برگ (از قسمت تحتانی) از هر تکرار را به دقت شسته و سپس به تکه‌های یک سانتی‌متری بریده و درون لوله‌های فالكون به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ °C در حمام آب گرم قرار گرفتند. بعد از سه ساعت، هدایت الکتریکی محلول‌ها با استفاده از هدایت سنج الکتریکی مدل (PT-20) اندازه‌گیری

شد. سپس لوله‌های فالكون در دمای °C ۱۰۰ در حمام آب گرم به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. آنگاه برای بار دوم هدایت الكتریکی آنها پس از سرد شدن و رسیدن به دمای اتاق اندازه‌گیری شد. نشت الكترولیتی محلول‌ها با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$EC \text{ (درصد)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

که در این فرمول  $C_1$  و  $C_2$  به ترتیب هدایت الكتریکی محلول قبل و بعد از جوش می‌باشد.

### ۳-۳-۳ اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ

۰/۲ گرم از جوان‌ترین برگ توسعه یافته هر گیاه (Wf) جدا کرده و سپس نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت درون آب مقطر شناور می‌کنیم و در یخچال در دمای °C ۴ قرار می‌دهیم. بعد از طی مدت زمان آب‌گیری، قطعات برگ با دستمال کاغذی به آرامی خشک می‌گردند و بلافاصله وزن می‌شوند، تا وزن درهنگام تورژسانس (Wt) به دست‌آید. پس از آن قطعات برگ در °C ۷۰ به مدت ۴۸ ساعت خشک می‌گردند تا وزن خشک (Wd) به دست‌آید. سپس RWC از طریق رابطه زیر محاسبه می‌کنیم:

$$RWC = (Wf - Wd) / (Wt - Wd) \times 100$$

### ۳-۳-۳ هدایت روزنه‌ای برگ

به منظور اندازه‌گیری میزان هدایت روزنه‌ای (میلی‌مول در مترمربع در ثانیه) و انتشار بخار از داخل برگ از دستگاه پرتابل SC-1 Leaf porometer استفاده گردید.

### ۳-۳-۳ استخراج و سنجش گلیکوزیدها

استخراج استویوزید و ریبودیوزاید A از اندام‌های هوایی گیاهان تیمار شده و شاهد بر اساس روش (۸۵) انجام شد. ابتدا برگ استویا هر تیمار خشک شده و آسیاب شدند و سپس با ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شدند. سپس در بن‌ماری به مدت ۳۰ دقیقه و دمای °C ۷۰ قرار داده شد. سپس از کاغذ صافی برای جداسازی عصاره استفاده شد. در ادامه برای تغلیظ نمونه‌ها در هوای آزاد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و دوباره ۵۰۰ میکرولیتر اتانول به عصاره تغلیظ شده اضافه شد. این نمونه‌های آماده شده

به دستگاه HPLC تزریق شدند. سنجش استویوزید و ربادیوزید A با روش (۱۲۱) انجام شد که از دستگاه HPLC مدل (Knauer، آلمان) و از ستون آمین (شرکت Teknokroma، اسپانیا) با طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر ۴/۶ میلی‌متر و با اندازه ذرات ۵ میکرومتر استفاده شد. سرعت جریان حلال ۰/۸ میلی-لیتر بر دقیقه و فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک، حاوی آب و استونیتریل به ترتیب با نسبت ۲۰:۸۰ بود و آشکارساز (detector) دستگاه از نوع uv بود و طول موج ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد.

در طرح آزمایشی ۱ اثر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در القای تنش اکسیداتیو و افزایش مقاومت و عملکرد در سرخارگل بررسی گردید؛ القای تنش اکسیداتیو از طریق اندازه‌گیری فعالیت NADPH اکسیداز و غلظت پراکسید هیدروژن، افزایش مقاومت از طریق اندازه‌گیری فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و آسکورات پراکسیداز و فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از جمله فنل کل و اسید آسکوربیک گلبرگ نشان داده شد؛ در نهایت تأثیرپذیری پروتئین محلول برگ، کلروفیل a و b، وزن خشک برگ و عملکرد وزن خشک گل از محلول پاشی سنجیده شد.

در طرح آزمایشی ۲ نیز اثر اسید سالیسیلیک و جاسمونیک بر آنزیم‌های محرک تنش اکسیداتیو، دفاعی و روند تغییرات ترکیبات فنلی در سرخارگل در شرایط مزرعه‌ای بررسی گردید.



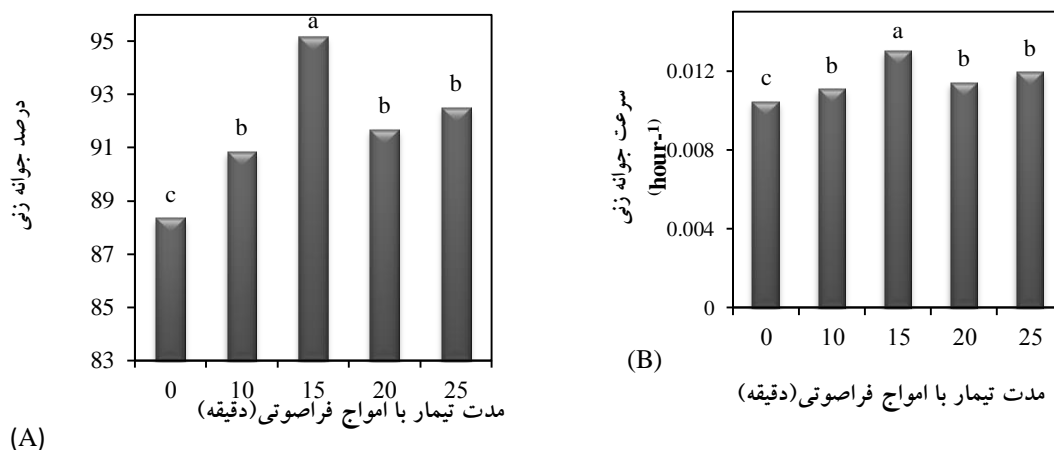
# فصل چهارم: نتایج و بحث

## ۴-۱ اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۱-۱ پیوست، ۴-۱-۲ پیوست و ۴-۱-۳ پیوست نشان داد که تیمار با امواج فراصوتی بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

### ۴-۱-۱ درصد و سرعت جوانه‌زنی در سرخارگل

شکل ۴-۱-۱ نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی تحت اثر مدت‌های مختلف تیمار با امواج فراصوتی را نشان می‌دهد، هر چهار مدت تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی نسبت به شاهد گردید. درصد جوانه‌زنی در تیمارهای ۱۵، ۲۵، ۲۰ و ۱۰ دقیقه تیمار با امواج فراصوتی به ترتیب ۹۵/۱، ۹۲/۹۵، ۹۱/۶، ۹۰/۸۳ و در تیمار شاهد ۸۸/۳ درصد بود. بیشترین سرعت جوانه‌زنی در تیمار ۱۵ دقیقه با میانگین ۰/۰۱۳۰ در ساعت مشاهده گردید (شکل B ۴-۱-۱). به نظر می‌رسد که ارتعاشات پی‌در پی امواج فراصوتی سبب نفوذپذیرتر شدن پوسته بذر و تسریع در جذب آب به داخل بذر شده باشد. افزایش جذب آب باعث شتاب در آماس بذرهای تحت تأثیر امواج فراصوتی گردیده و بدنبال آن، جوانه‌زنی بهبود یافت.



شکل ۴-۱-۱- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر درصد جوانه‌زنی (A) و سرعت جوانه‌زنی (hour<sup>-1</sup>) (B)



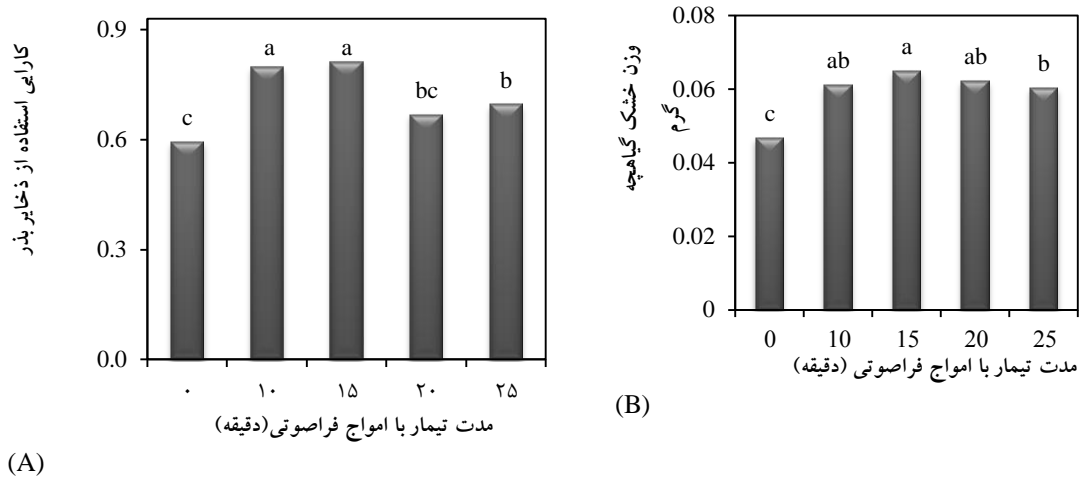
## ۴-۱-۲ کارایی استفاده از ذخایر بذر در سرخارگل

شکل A ۴-۱-۲ نتایج مربوط به مقایسه‌ی میانگین‌های کارایی استفاده از ذخایر بذر (نسبت وزن خشک گیاهچه به میزان تخلیه بذر) را نشان می‌دهد. تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذر در اغلب تیمارها نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان کارایی استفاده از ذخایر بذر در تیمار ۱۵ و ۱۰ دقیقه با میانگین‌های ۰/۸۱ و ۰/۷۹ و کمترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با میانگین ۰/۵۹ مشاهده گردید. افزایش کارایی ذخایر بذری وابسته به آنزیم‌های هیدرولیتیکی می‌باشد که سبب تجزیه‌ی مواد ذخیره‌ای بذر و در نهایت مصرف آن توسط گیاهچه می‌گردد. زمان بین آبنوشی و جوانه‌زنی بذرهای زمانی است که آنزیم‌های لازم برای جوانه‌زنی فعال می‌گردد. افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذری در اثر تیمار با امواج فراصوتی می‌تواند مربوط به افزایش نفوذ پذیری پوسته بذر، تسریع در جذب آب و آماس بافت‌ها باشد. علاوه بر این، بالا رفتن دمای بافت‌ها تحت اثر امواج فراصوتی نیز می‌تواند دخیل باشد (۱۴۸).

## ۴-۱-۳ وزن خشک گیاهچه در سرخارگل

شکل B ۴-۱-۲ روند تغییرات وزن خشک گیاهچه را تحت اثر امواج فراصوتی نشان می‌دهد، افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذر تحت اثر تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش وزن خشک گیاهچه در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد شد. چن و همکاران (۲۰۱۲) نیز بهبود خصوصیات جوانه‌زنی در بذرهای پیش‌تیمار شده با امواج فراصوت را ناشی از افزایش جذب آب و شتاب در آماس بذرهای تحت تأثیر تیمار با امواج فراصوتی نسبت دادند و بیان داشتند که پیامد آن افزایش وزن تر آن‌ها بود (۷۹). یلداگارد و همکاران (۲۰۰۸) افزایش وزن گیاهچه در بذرهای پیش‌تیمار شده با امواج فراصوت را به افزایش و تسریع متابولیسم با محتوی آبی بیشتر در گیاهان مرتبط دانستند (۲۱۸). یکی دیگر از دلایل افزایش وزن خشک گیاهچه در تیمارهای تیمار شده با امواج فراصوت را می‌توان به افزایش

کارایی ذخایر بذری و پویایی ذخایر بذری نسبت داد که بدنبال آن، سرعت متابولیسم بذرها افزایش یافته و تولید ماده‌ی خشک بیشتر گردید (۲۱۸).



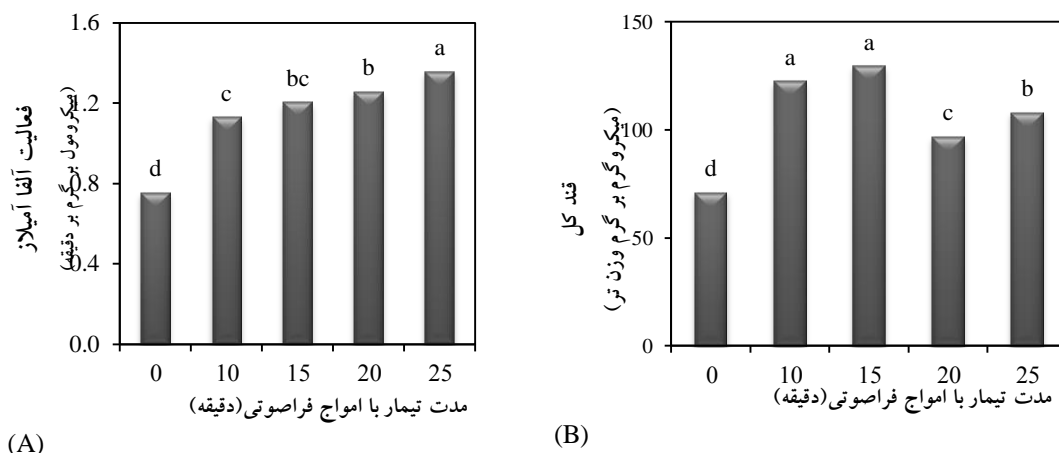
شکل ۴-۱-۲- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر کارایی استفاده از ذخایر بذر (A) و وزن خشک گیاهچه (B)

#### ۴-۱-۴ فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در سرخارگل

شکل A ۴-۱-۳ روند تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز را تحت اثر مدت‌های مختلف تیمار با امواج فراصوتی نشان می‌دهد، هر چهار مدت تیمار سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز نسبت به شاهد گردید. در بذره‌های پیش تیمار شده با امواج فراصوتی بر بذر جو گزارش شده است که فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و بدنبال آن جوانه‌زنی بذر جو افزایش یافته بود (۸۴). آن‌ها دلیل افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و جوانه‌زنی جو را به افزایش نفوذپذیری پوسته جو نسبت به آب، تسهیل در نفوذپذیری و افزایش سرعت نفوذ آب و به دنبال آن آماس بذر نسبت دادند (۲۱۸). محققان متعددی (۱۵۱، ۱۴۸، ۱۹۶ و ۲۱۸) افزایش سیالیت دیواره سلولی در نتیجه حرکت عناصر غذایی موجود در آندوسپرم را یکی دیگر از دلایل افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بیان داشتند.

#### ۴-۱-۵ قند کل در سرخارگل

در شکل B ۴-۱-۳ روند تغییرات میزان قند کل تحت اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی ارائه شده است، هر چهار مدت تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش میزان قند کل نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان قند کل در تیمارهای ۱۰ و ۱۵ دقیقه حاصل گردید. جوانه‌زنی بذره‌های خشک و در حال سکون با جذب آب شروع می‌شود. جذب آب سبب افزایش سطح جیبرلیک اسید شده و بدنبال آن، جیبرلیک اسید موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک از جمله آلفا آمیلاز می‌گردد. این افزایش منجر به تجزیه نشاسته به قند می‌گردد. هیدرولیز نشاسته یکی از اساسی‌ترین فعالیت‌ها در طول جوانه‌زنی می‌باشد زیرا تحرک قندهای کل نقش مهمی را در جهت کاهش پتانسیل آبی سلول و در نتیجه ورود آب به سلول و طویل شدن سلول را سبب گشته و موجبات رشد گیاهچه را فراهم می‌آورد (۳۶). افزایش قندهای کل حتی بیان ژن‌های دخیل در تنظیم فرآیند اسمزی را در این مرحله تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵).

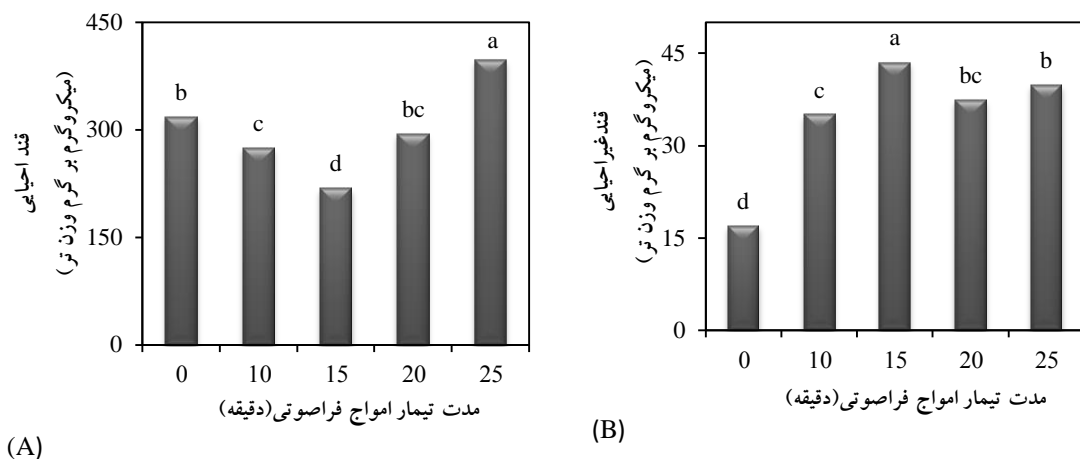


شکل ۴-۱-۳- مقایسه‌ی میانگین اثر تیمار امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (A) و قند کل (B) بذر جوانه‌زده سرخارگل.

#### ۴-۱-۶ روند تغییرات قندهای احیایی و غیر احیایی در سرخارگل

روند تغییرات میزان قندهای احیایی و غیر احیایی تحت اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی در شکل ۴-۱-۴ ارائه شده است، میزان قندهای احیایی در تیمار ۲۵ دقیقه با میانگین ۴۰۵/۵ میکروگرم بر گرم بافت تر در رتبه‌ی اول قرار داشت و شاهد با میانگین ۳۱۸ میکروگرم بر گرم بافت تر، رتبه‌ی دوم را به

خود اختصاص داد (شکل A ۴-۱-۴). کمترین میزان قند احیایی نیز در تیمار ۱۵ دقیقه مشاهده شد. بیشترین میزان قندهای غیراحیایی در تیمار ۱۵ دقیقه امواج فراصوتی با میانگین ۴۳/۵ و کمترین مقدار آن در شاهد با میانگین ۱۶/۹ میکروگرم بر گرم بافت تر گیاهچه مشاهده شد (شکل B ۴-۱-۴). افزایش میزان قندهای غیراحیایی در بذره‌های تیمار شده با امواج فراصوتی ممکن است با پویایی بالای ذخایر بذری مرتبط باشد. کاهش میزان قندهای احیایی در تیمار ۱۵ دقیقه ممکن است مربوط به سرعت بالای هیدرولیز نشاسته باشد که طی آن، قندهای احیایی به قندهای غیراحیایی مثل ساکارز جهت انتقال به محور جنینی تبدیل می‌شوند. در محور جنینی، ساکارز توسط آنزیم اینورتاز شکسته شده و برای تغذیه جنین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹۴ و ۵).

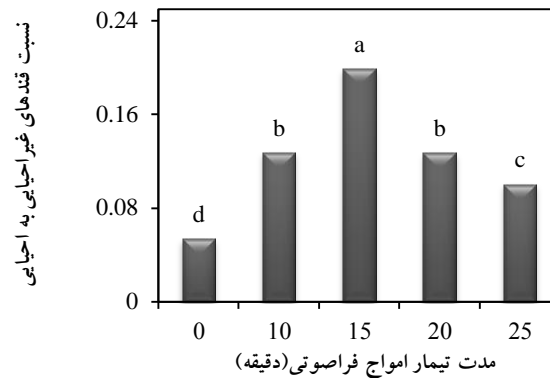


شکل ۴-۱-۴- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر میزان قندهای احیایی و غیراحیایی (A) و (B) بذر جوانه‌زده سرخارگل.

#### ۴-۱-۷ نسبت قندهای غیراحیایی به قندهای احیایی در سرخارگل

مقایسه‌ی میانگین تغییرات نسبت قندهای غیراحیایی به احیایی در شکل ۴-۱-۵ ارائه شده است، این نسبت در تیمارهای شاهد (صفر دقیقه)، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه تیمار امواج فراصوتی به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۱۳، ۰/۲، ۰/۱۳ و ۰/۱ بود. بیشترین مقدار این نسبت در تیمار ۱۵ دقیقه‌ای بدست آمد. بالا بودن میزان قندهای غیراحیایی به نفع جنین می‌باشد زیرا بالا بودن میزان قندهای احیایی نسبت به غیراحیایی یعنی اینکه بذر در شرایط تنش بوده و موجب بالا رفتن تنفس در جنین می‌شود. قندهای احیایی نقش مهمی در واکنش‌های آمادری مایلارد به عهده دارند (۲۱۵). تجمع قندهای احیایی منجر

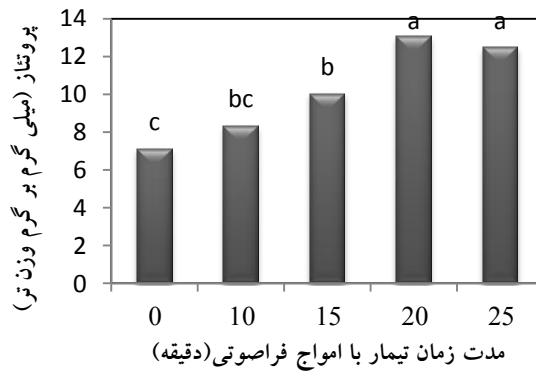
به افزایش سرعت تنفس شده و انرژی و اصطلاحاً مهیا بودن غذا برای بذره‌های در حال جوانه‌زنی را کاهش می‌دهد (۲۱۵ و ۲۳).



شکل ۴-۱-۵- مقایسه‌ی میانگین اثر تیمار امواج فراصوتی بر نسبت قندهای غیر احیایی به احیایی

#### ۴-۱-۸- فعالیت آنزیم پروتئاز در سرخارگل

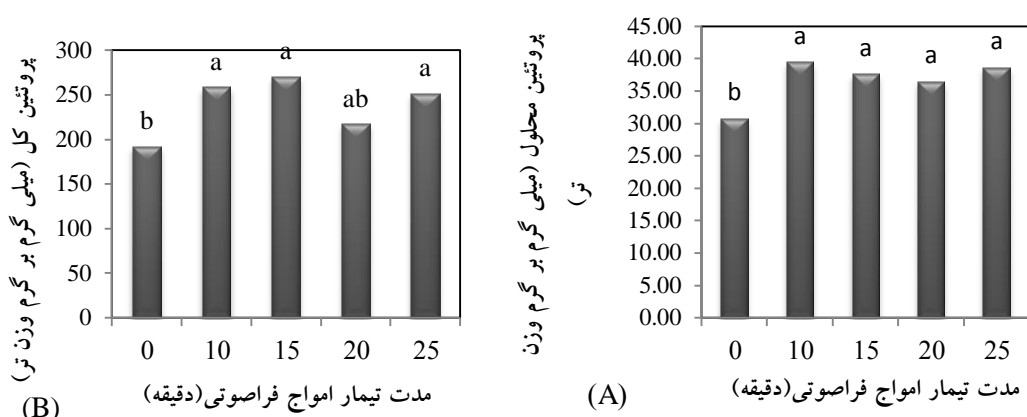
شکل ۴-۱-۶ روند تغییرات آنزیم پروتئاز تحت اثر امواج فراصوتی را نشان می‌دهد. امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز گردید، همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش مدت تیمار امواج فراصوتی فعالیت آنزیم پروتئاز افزایش پیدا کرد؛ بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مدت‌های ۲۰ و ۲۵ دقیقه با میانگین‌های ۱۳ و ۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد و کمترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با میانگین ۷/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد. گزارش شده است که افزایش سرعت جوانه‌زنی در بذره‌های تیمار شده با امواج فراصوتی ناشی از افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و دهیدروژناز می‌باشد (۷۹ و ۱۵۳). پروتئاز باعث کاهش پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذره‌های در حال جوانه‌زنی می‌شود که این کاهش با فعالیت آندو پروتئازها شروع شده، این آنزیم‌ها پروتئین‌های ذخیره‌ای نامحلول را به پپتیدهای محلول تبدیل می‌کنند (۷۹).



شکل ۴-۱-۶- مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز

#### ۴-۱-۹ روند تغییرات پروتئین محلول و کل در سرخارگل

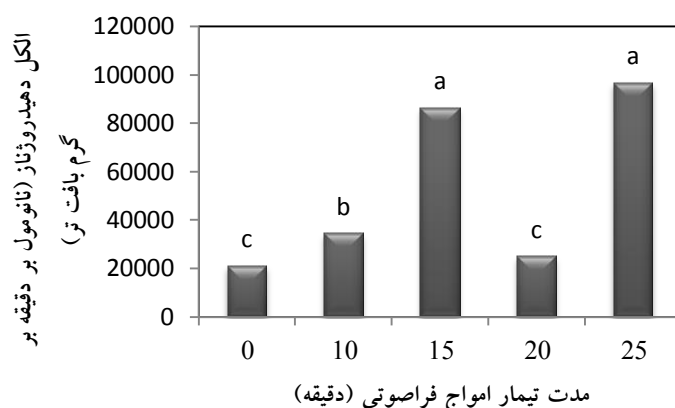
در شکل A ۴-۱-۷ مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر روند تغییرات پروتئین نشان داده شده است، همه‌ی مدت‌های تیمار امواج فراصوتی سبب افزایش میزان پروتئین محلول نسبت به شاهد گردید. شکل B ۴-۱-۷ مقایسه میانگین روند تغییرات پروتئین کل را تحت اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی نشان می‌دهد. امواج فراصوتی سبب افزایش غلظت پروتئین کل در اغلب تیمارها نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان پروتئین کل در مدت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۵ دقیقه مشاهده شد و در تیمار شاهد کمترین مقدار مشاهده شد. پروتئین‌های ذخیره‌ای که در بذرها سنتز و ذخیره می‌شوند بعنوان منبع نیتروژن و کربن در طی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه مصرف می‌شوند. به هنگام شرایط مطلوب جوانه‌زنی این پروتئین‌ها توسط پروتئازها تحت فرآیندهای پروتئولیتیکی قرار گرفته و می‌شکنند. شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان‌دهنده‌ی از بین رفتن مکانیسم بازدارنده در مقابل تجزیه می‌باشد. پروتئاز باعث کاهش پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذرها در حال جوانه‌زنی می‌شود (۱۰۵ و ۷۹). در جریان کاتابولیسم و آنابولیسم در هنگام جوانه‌زنی پروتئین کل افزایش پیدا می‌کند و چون پیش تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز (شکل ۴-۱-۶) و آرژیناز (شکل ۴-۱-۱۰) گردید و به دنبال انتقال آن به محور جنینی و ساخت ترکیبات پروتئینی جدید سبب افزایش پروتئین کل در همه‌ی تیمارهای امواج فراصوتی نسبت به شاهد گردید.



شکل ۴-۱-۷ مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر میزان پروتئین محلول (A) و کل (B) ۲۴ ساعت پس از جوانه‌زنی.

### ۴-۱-۱۰ فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز در سرخارگل

شکل ۴-۱-۸ روند تغییرات فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز را تحت اثر زمان‌های مختلف پیش‌ تیمار با امواج فراصوتی نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مدت تیمارهای با امواج فراصوتی ۱۵ و ۲۵ دقیقه و کمترین میزان آن در تیمار شاهد و تیمار ۲۰ دقیقه پیش‌ تیمار با امواج فراصوتی مشاهده شد. پیش‌ تیمار در بیشتر زمان‌ها سبب افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد گردید؛ از آنجا که ضربه‌های ممتد امواج فراصوتی به بذر، سبب نفوذپذیری پوسته‌ی بذر و تسریع در فرآیند آبنوشی و آماس بذر می‌گردد بعد از آبنوشی و آماس بذر کمبود اکسیژن در بذر رخ می‌دهد، چون انتشار گاز در آب ده‌هزار مرتبه کاهش می‌یابد، آبنوشی بذر نفوذپذیری  $O_2$  را ضعیف می‌کند در این شرایط تولید انرژی از طریق تخمیر اتفاق می‌افتد (۱۶، ۱۰۲ و ۲۰۵)، پیشنهاد می‌شود که فعالیت بالاتر الکل‌دهیدروژناز (ADH) عاملی مهمی در تأمین سریع‌تر انرژی بعد از آبنوشی بذر در شرایط کمبود اکسیژن جهت فعالیت سوخت و ساز فرآیند جوانه‌زنی باشد. افزایش فعالیت این آنزیم در زمان جوانه‌زنی بذر ذرت گزارش شده است (۷۸). آن‌ها بیشترین میزان فعالیت این آنزیم را ۲۴ ساعت بعد از آبنوشی گزارش نمودند و بیان داشتند که ۷۲ ساعت بعد از آبنوشی، فعالیت این آنزیم بسیار کاهش یافت و سپس ثابت ماند که می‌توان به وجود اکسیژن کافی نسبت داد (۲۰۵).

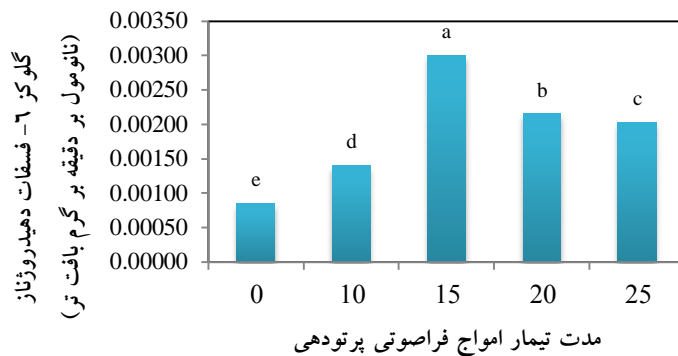


شکل ۴-۱-۸- مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر آنزیم الکل دهیدروژناز ۲۴ ساعت پس از جوانه زنی.

#### ۴-۱-۱۱- فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز در سرخارگل

مقایسه میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز تحت اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی در شکل ۴-۱-۹ ارائه شده است. امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مدت ۱۵ دقیقه مشاهده شد و بعد از آن فعالیت آنزیم رو به کاهش نهاد. در زمان جوانه‌زنی فعالیت دهیدروژنازها افزایش پیدا می‌کند یکی از این دهیدروژنازها گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز می‌باشد، فعالیت این آنزیم NADPH را برای تنفس از طریق مسیر پنتوز فسفات تأمین می‌کند؛ همچنین NADPH را برای واکنش‌های بیوسنتزی اکسیداسیون و احیا تأمین می‌کند. در پلاستیدهای غیرسبز (مانند آمیلوپلاست‌ها) و در پلاست‌هایی که در تاریکی عمل می‌کنند و در زمانی که هنوز گیاهچه در مرحله‌ی هتروتروفی به سر می‌برد، مسیر پنتوز فسفات با کمک آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز NADPH (فرم احیایی) لازم برای واکنش‌های بیوسنتزی لیپید و آسمیلاسیون نیتروژن را تأمین می‌کند (۱۳۲ و ۵۵ و ۱۸۷ و ۹۳). فعالیت این آنزیم بسیار مهم است زیرا با کاهش فعالیت این آنزیم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول کاهش می‌یابد، مطالعات متعددی G6PDH را به عنوان پتانسیلی از منبع NADPH در گیاهچه که در معرض محدودیت نوری قرار دارد بیان نمودند (۹۳ و ۱۳۹ و ۲۰۸).

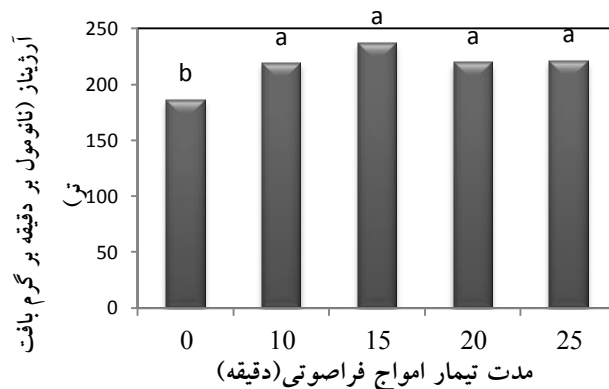




شکل ۴-۱-۹- مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز

#### ۴-۱-۱۲- فعالیت آنزیم آرژیناز در سرخارگل

شکل ۴-۱-۱۰- مقایسه میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم آرژیناز را تحت اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی نشان می‌دهد. امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد شد. آرژیناز آرژینین را به اوره و اورنتین تبدیل می‌کند. اورنتین پیش‌سازهای بیوسنتز پلی‌آمین-هایی همچون پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین می‌باشد. اوره موجود در واکنش اوره‌آزی به آمونیوم و  $CO_2$  تبدیل می‌شود. آمونیوم تولیدی جهت بیوسنتز اسیدهای آمینه توسط سیستم آنزیمی GS/GOGAT مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳۶ و ۲۲۰). وجود آرژینین به مقدار زیاد در پروتئین‌های ذخیره‌ای بسیار مهم می‌باشد. آرژینین در مقایسه با سایر آمینواسیدها دارای نیتروژن بالایی می‌باشد. زیرا دارای گروه گوآنیدو می‌باشد. به طور کلی ۱۸٪ از نیتروژن کل بذر را آرژینین در بر می‌گیرد. در زمان جوانه‌زنی بذرهای آمینواسیدهای غنی از نیتروژن، نیتروژن را برای متابولیسم‌های بعدی آزاد می‌سازند، فعالیت بیشتر آرژیناز، نیتروژن بیشتری را برای متابولیسم بعدی فراهم می‌آورد (۱۰۳، ۱۰۵ و ۲۲۰).



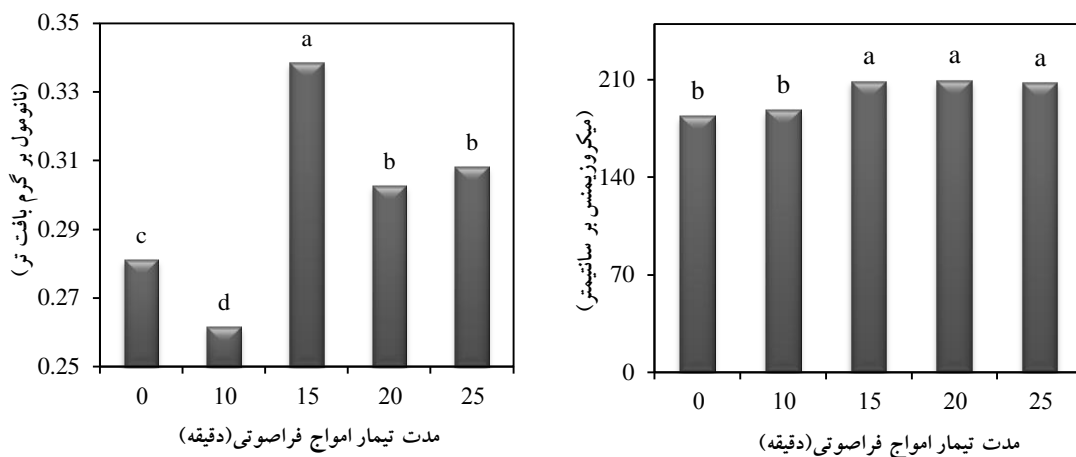
شکل ۴-۱۰-۱- مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم آرژیناز بذر سرخارگل

#### ۴-۱-۱۳ پراکسید هیدروژن در سرخارگل

شکل A ۴-۱-۱۱ مقایسه‌ی میانگین تغییرات پراکسید هیدروژن بر اثر امواج فراصوت را نشان می‌دهد. در بیشتر تیمارهای امواج فراصوتی به ویژه تیمار ۱۵ دقیقه، میزان پراکسید هیدروژن بیشتر از شاهد بود. امواج فراصوت، امواج مکانیکی هستند که فرکانس آن‌ها بیش از ۲۰ KHZ بوده و دارای انرژی بالایی می‌باشند و می‌توانند سبب بالا رفتن دمای بافت‌ها شوند (۱۴۸). بالا رفتن دما به همراه ضربه‌های ممتد امواج فراصوت ممکن است سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن گردند. افزایش دمای بافت‌ها در یک زمان کوتاه ممکن است علت افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهچه باشد.

#### ۴-۱-۱۴ هدایت الکتریکی در سرخارگل

در شکل B ۴-۱-۱۱ نتایج مقایسه میانگین اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی بر هدایت الکتریکی بذر سرخارگل ارائه شده است، امواج فراصوتی در مدت‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه سبب افزایش هدایت الکتریکی بذرها نسبت به شاهد گردید. شایان ذکر است که بین تیمار ۱۰ دقیقه و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. ضربه‌های ممتد امواج فراصوت سبب نفوذپذیری پوسته، غشاهای بذر و افزایش جذب آب گردیده و بدنبال آن، نشت مواد به محیط آبی زیاد شده هدایت الکتریکی افزایش یافت.



شکل ۴-۱-۱۱- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر غلظت پراکسید هیدروژن (نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر) (A) و هدایت الکتریکی (B) (میکروزیمنس بر سانتی‌متر)

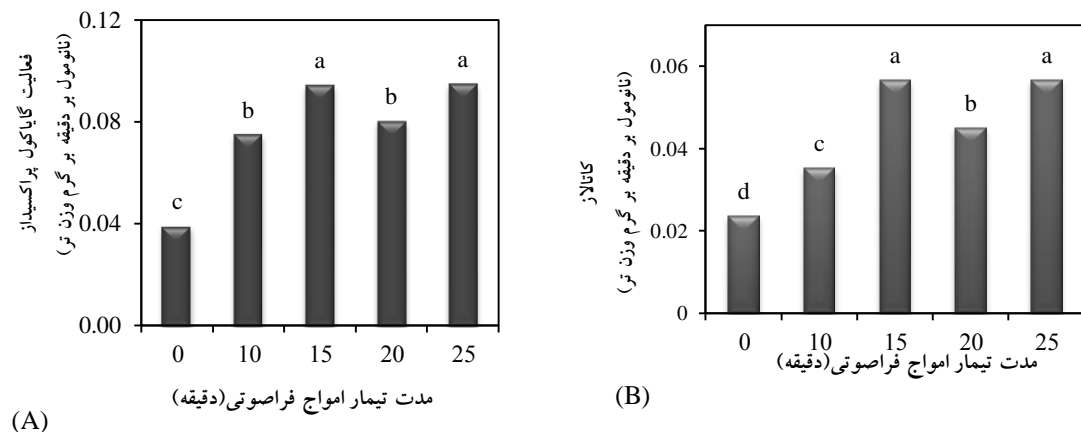
#### ۴-۱-۱۵ گایاکول پراکسیداز در سرخارگل

در شکل A ۴-۱-۱۲ مقایسه میانگین روند تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز بر گیاهچه‌ی سرخارگل ارائه شده است، بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمارهای ۱۵ و ۲۵ دقیقه امواج فراصوتی با میانگین  $0/094$  و کمترین آن در تیمار شاهد با میانگین  $0/035$  نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده گردید. گایاکول پراکسیداز (GPX) از اکسیداسیون ترکیبات فنلی گایاکول برای سم-زدایی و تجزیه‌ی آب اکسیژنه استفاده می‌کند، گایاکول به عنوان دهنده‌ی الکترون عمل می‌کند، گایاکول پراکسیداز در سیتوزول، دیواره‌ی سلولی و واکوئول نیز دیده می‌شود از این‌رو افزایش آن برای پالایش گونه‌های فعال اکسیژن مفید می‌باشد (۱۱۵ و ۱۵۹).

#### ۴-۱-۱۶ کاتالاز در سرخارگل

در شکل B ۴-۱-۱۲ روند تغییرات آنزیم‌های کاتالاز تحت اثر مدت‌های مختلف تیمار با امواج فراصوتی ارائه شده است، بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در مدت‌های ۱۵ و ۲۵ دقیقه با میانگین  $0/056$  و کمترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با میانگین  $0/023$  نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده گردید. کاتالاز از پراکسید هیدروژن به عنوان سوستر استفاده می‌کند و با تجزیه‌ی سریع این ماده اثرهای

مخرب آن را مهار می‌کند. پراکسید هیدروژن برای سلول‌های گیاهی به خصوص کلروپلاست بسیار مضر می‌باشد. چرا که در غلظت‌های پایین باعث مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه‌ی کلوین به ویژه آنزیم‌های دارای گروه سولفیدریل از جمله گلیسرآلدیید، ۳-فسفات دهیدروژناز و فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات می‌شود. کاتالاز فقط در پراکسی‌زوم وجود دارد بنابراین دامنه‌ی فعالیت آن محدود است (۱۶۶).



شکل ۴-۱-۱۲- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (A) و کاتالاز (B) گیاهچه‌ی سرخارگل

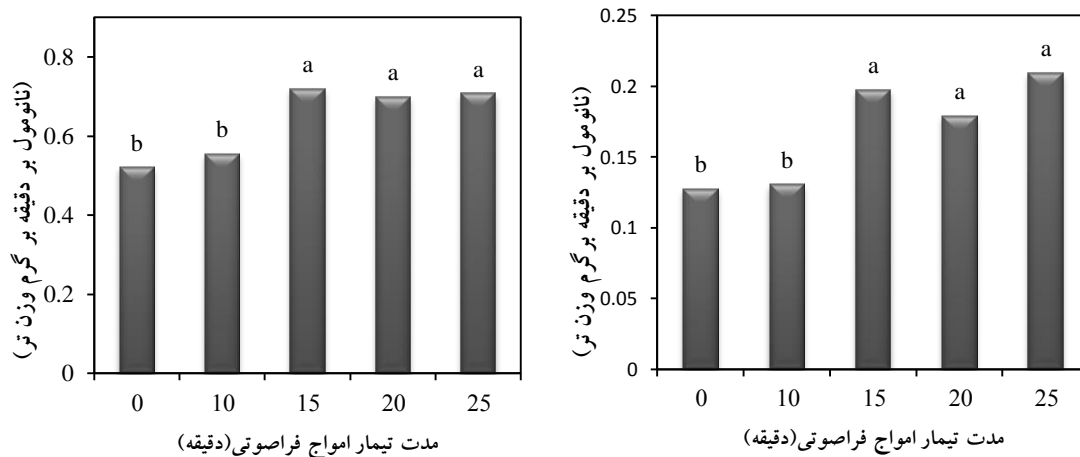
#### ۴-۱-۱۷- گلوکاتایون S- ترانسفراز در سرخارگل

تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز در بیشتر مدت‌های تیمار امواج فراصوتی گردید (شکل ۴-۱-۱۳)، بیشترین میزان فعالیت گلوکاتایون S- ترانسفراز در مدت‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه و کمترین در مدت‌های صفر و ۱۰ دقیقه مشاهده شد. با افزایش مدت تیمار با امواج فراصوتی فعالیت همه‌ی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر شد و سبب پالایش گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهچه گردید. علاوه بر این اگر چه تیمار با امواج فراصوتی به همراه ضربه‌های ممتد و انرژی بالا بوده و سبب بالا رفتن بافت‌ها می‌گردد، اما چون اعمال تیمار در محیطی سیال (آب) صورت گرفت، آب به عنوان بافر بین گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و بافت گیاهچه عمل نموده و سبب متوقف شدن خودبه‌خودی زنجیره‌های فعال حین پراکسیداسیون لیپید می‌گردد (۷۹ و ۱۵۸). بنابراین

همان طور که نتایج مقایسه‌ی میانگین‌های خصوصیات جوانه‌زنی نشان می‌دهد امواج فراصوتی اثر زیان-باری نداشته و سبب افزایش همه‌ی موارد نسبت به شاهد گردید (۷۹).

#### ۴-۱-۱۸ فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در سرخارگل

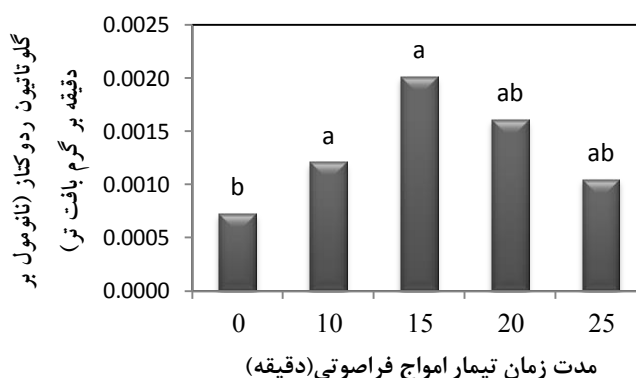
روند تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز تحت اثر امواج فراصوتی در شکل ۴-۱-۱۳ نشان داده شده است، پیش‌تیمار بذرها با امواج فراصوت به مدت ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز گردید، مدت تیمارهای صفر و ۱۰ دقیقه در یک سطح آماری قرار داشتند. پلی‌فنل‌اکسیدازها در تمام بخش‌های گیاه یافت می‌شوند و از فنل‌ها به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند (۱۶۶ و ۱۱۵). پراکسیدازهای محلول و آپوپلاستی می‌توانند با مشارکت فنل‌ها و اسید آسکوربیک، پراکسید هیدروژن را حذف کنند. پلی‌فنل‌اکسیداز یا تیروزیناز آنزیمی است که دارای دو اتم مس در هسته مرکزی خود می‌باشد و اکسیداسیون دی‌فنل‌ها به کینون‌ها را انجام می‌دهد. این آنزیم در این واکنش از اکسیژن مولکولی به عنوان سوپسترا استفاده می‌نماید (۱۱۵).



شکل ۴-۱-۱۳- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز (A) و پلی‌فنل‌اکسیداز (B)، گیاهچه‌ی سرخارگل.

#### ۴-۱-۱۹ فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در سرخارگل

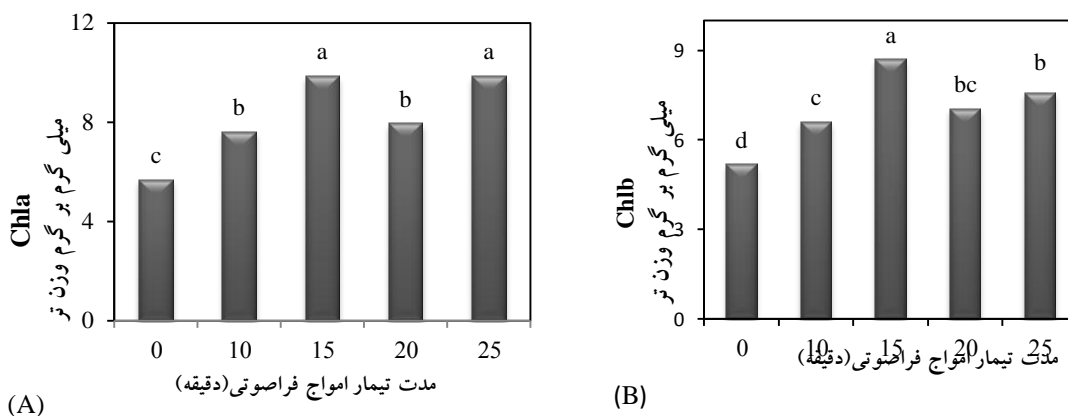
شکل ۴-۱-۱۴ فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز را تحت اثر مدت‌های مختلف تیمار با امواج فراصوتی نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مدت زمان ۱۵- و ۲۰ دقیقه تیمار با امواج فراصوتی مشاهده گردید. گلوتاتیون ردوکتاز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشد که حذف  $H_2O_2$  را از طریق چرخه‌ی مونودهیدروآسکورات انجام می‌دهد. این آنزیم مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیا شده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به GSSG می‌باشد (۵۱). گلوتاتیون در چرخه‌های گزانتوفیل، مه‌لر و آسکورات - گلوتاتیون نقش مؤثری را در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفا می‌کند. از این رو افزایش فعالیت GR به دلیل احیای مجدد گلوتاتیون اکسید شده بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۸۷ و ۵۱). یکی از دلایل افزایش میزان فعالیت این آنزیم را می‌توان به بالا بودن فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در تیمارهای امواج فراصوتی نسبت داد که میزان NADPH بیشتری را برای فعالین آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز را فراهم می‌کند (۵۱ و ۱۵۹). بالا بودن سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به عنوان یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به جهت مقابله با تنش‌های احتمالی بسیار مفید می‌باشد.



شکل ۴-۱-۱۴- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز.

## ۲۰-۱-۴ کلروفیل a و b در سرخارگل

شکل ۱۵-۱-۴ روند تغییرات کلروفیل a و b گیاهچه را در تحت اثر مدت‌های مختلف تیمار با امواج فراصوتی نشان می‌دهد. امواج فراصوتی سبب افزایش میزان کلروفیل a و b در تمامی مدت‌های تیمار نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به ۱۵ و ۲۵ دقیقه بود. بیشترین غلظت کلروفیل b در تیمار ۱۵ دقیقه امواج فراصوتی مشاهده شد. امواج فراصوت سبب افزایش سرعت جوانه‌زنی و در نتیجه، تسریع ورود گیاه به فاز اتوتروفی گردید. افزایش میزان کلروفیل‌ها، افزایش جذب نور و تولید ماده‌ی خشک در مرحله گیاهچه‌ای می‌تواند بر رشد و نمو گیاه در مراحل بعدی مؤثر باشد. گزارش شده است که تیمار با امواج فراصوتی، قدرت بذر در گیاهان مختلف را افزایش می‌دهد، اما شرایط بهینه اعمال تیمار امواج فراصوتی در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (۲۱۸ و ۷۹).

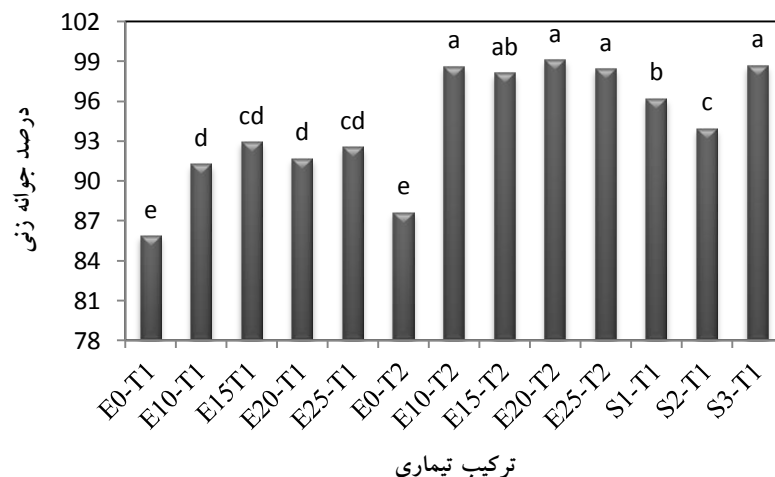


شکل ۱۵-۱-۴- مقایسه‌ی میانگین اثر امواج فراصوتی بر غلظت کلروفیل a (A) و b (B) در گیاهچه‌ی سرخارگل.

نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۱-۴ پیوست نشان داد که اثر پیش تیمار پنج مدت امواج فراصوتی - دمای ۲۵ °C انکوباتور برای آزمون جوانه‌زنی و پیش تیمار ۵ مدت امواج فراصوتی - دمای متناوب انکوباتور برای آزمون جوانه‌زنی و پیش تیمار سرمایی-دمای ۲۵ °C انکوباتور برای آزمون جوانه‌زنی بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

#### ۴-۱-۲۱ درصد جوانه‌زنی در سرخارگل

شکل ۴-۱-۱۶ روند تغییرات اثر پیش‌تیمار امواج فراصوتی - دماهای جوانه‌زنی و پیش‌تیمار استراتیفیکاسیون - دمای جوانه‌زنی را بر درصد جوانه‌زنی بذر سرخارگل نشان می‌دهد. پیش‌تیمار بذر با امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما سبب بهبود جوانه‌زنی در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان جوانه‌زنی در تیمارهای E<sub>10</sub>-T<sub>2</sub> و E<sub>15</sub>-T<sub>2</sub>، E<sub>20</sub>-T<sub>2</sub> (پیش‌تیمار بذر) با امواج فراصوتی - تناوب دمایی) و S<sub>3</sub>-T<sub>1</sub> با میانگین حدود ۹۸ درصد مشاهده شد؛ کمترین میزان جوانه‌زنی نیز در تیمارهای E<sub>0</sub>-T<sub>1</sub> و E<sub>0</sub>-T<sub>2</sub> با میانگین ۸۸/۳ درصد مشاهده گردید. پیش‌تیمار بذر با امواج فراصوتی از طریق نفوذپذیر کردن پوسته، تسریع در فرآیند آبنوشی و نیز بالا بردن دمای بافت‌ها از طریق انرژی بالای امواج فراصوتی سبب تسریع در فرآیندهای بیوشیمیایی جوانه‌زنی و افزایش میزان جوانه‌زنی گردید. قرار گرفتن بذر بعد از پیش‌تیمار با امواج فراصوتی در دمای متناوب سبب بالا رفتن میزان جوانه‌زنی گردید. شاید محتمل‌ترین توضیح آن باشد که دماهای متناوب موجب تغییر موازنه مواد بازدارنده - تحریک‌کننده می‌شود که در چنین شرایطی چرخه دمای پایین موجب کاهش بازدارنده‌ها می‌شود و دمای بالا موجب افزایش تحریک‌کننده‌ها می‌شود که سرانجام به جوانه‌زنی منجر می‌گردد.

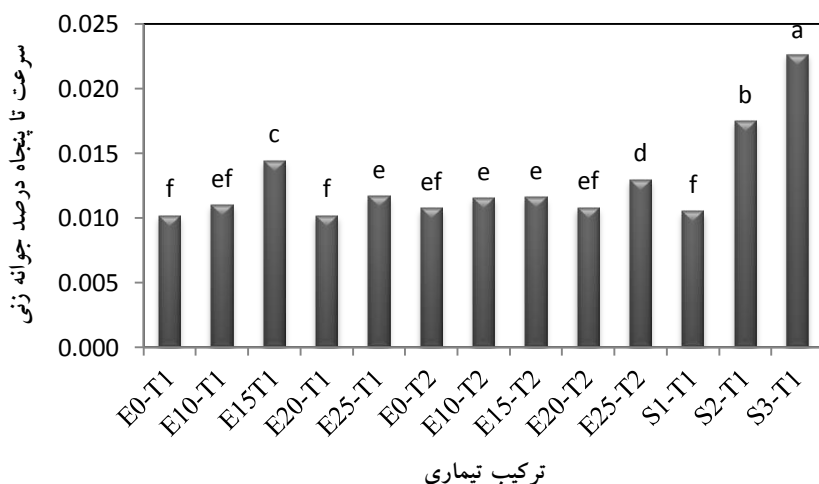


شکل ۴-۱-۱۶ اثر امواج فراصوتی - دماهای جوانه‌زنی و استراتیفیکاسیون - دمای جوانه‌زنی بر درصد جوانه‌زنی بذر سرخارگل، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: هفته سرمادهی و T: دمای.



#### ۴-۱-۲۲ سرعت تا پنجاه درصد جوانه‌زنی در بذر سرخارگل

شکل ۴-۱-۱۷ روند تغییرات اثر پیش‌تیمار امواج فراصوتی - دماهای جوانه‌زنی و پیش‌تیمار استراتیغیکاسیون - دمای جوانه‌زنی را بر سرعت تا پنجاه درصد جوانه‌زنی بذر سرخارگل را نشان می‌دهد. بیشترین میزان سرعت جوانه‌زنی در تیمار S<sub>3</sub>T<sub>1</sub> با میانگین ۰/۰۲۲ در ساعت و کمترین میزان آن نیز در تیمارهای E<sub>0</sub>T<sub>1</sub> و E<sub>20</sub>T<sub>1</sub> با میانگین حدود ۰/۰۰۹۹ در ساعت مشاهده شد. سرعت بالای جوانه‌زنی در تیمارهای دارای سرما را می‌توان به اثر سرما در مهار برخی از عوامل ممانعت‌کننده‌ی جوانه‌زنی بذر نسبت داد (۵) و یا تغییر در حساسیت جنین نسبت به تنظیم‌کننده‌های رشد و تغییر در فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با شکستن مواد ذخیره‌ای نسبت داد (۵۶). سرعت جوانه‌زنی یکی از شاخص‌های مهم در تعیین کیفیت بذر می‌باشد و هر چه بذرها بتوانند در مدت زمان کمتری، درصد جوانه‌زنی بیشتری داشته باشند از سرعت جوانه‌زنی بیشتری نیز برخوردار خواهند بود (۱۱ و ۲۷).

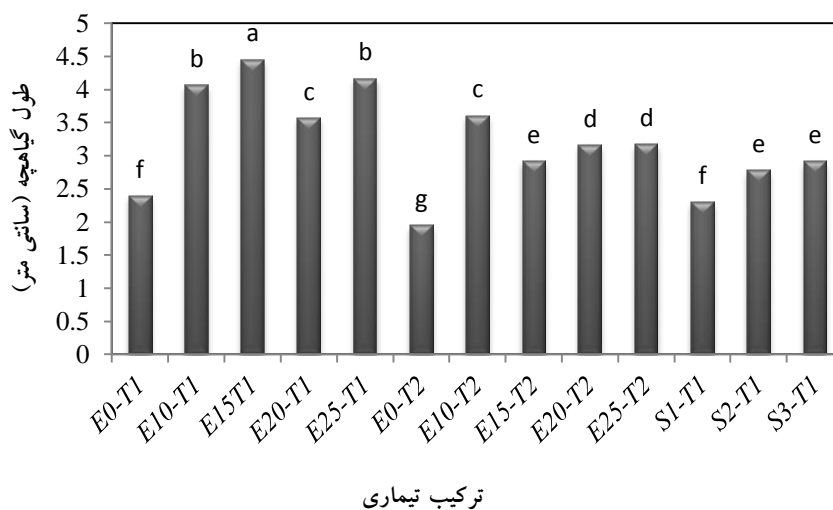


شکل ۴-۱-۱۷- اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دما بر R50 بذر سرخارگل، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: هفته سرمادهی و T: دما.

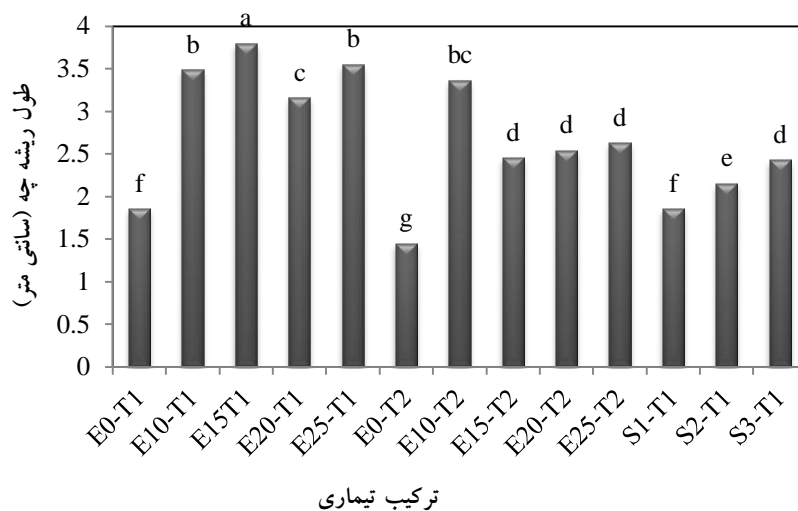
#### ۴-۱-۲۳ طول ریشه‌چه و گیاهچه در سرخارگل

شکل ۴-۱-۱۸ و ۴-۱-۱۹ نتایج مقایسه‌ی میانگین اثر تیمارهای امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دمای جوانه‌زنی را بر طول ریشه‌چه و گیاهچه بذر سرخارگل را نشان می‌دهد. بیشتر تیمارهای امواج فراصوتی در دمای ۲۵ °C و تناوب دمایی سبب افزایش طول ریشه‌چه و گیاهچه نسبت

به شاهد گردید. بیشترین میزان طول ریشه‌چه در تیمار E15T1 با میانگین ۳/۹۴ cm و کمترین میزان آن نیز در تیمار E0T2 با میانگین ۱/۷۵ cm مشاهده شد. بیشترین میزان طول گیاهچه نیز در تیمار E15T1 با میانگین ۴/۴۴ cm و کمترین میزان آن نیز در تیمار E0T2 با میانگین ۱/۹۴ cm مشاهده شد. پیش تیمار بذرها با امواج فراصوتی سبب نفوذپذیر کردن پوسته، تحریک و تهییج در جذب آب و افزایش سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی جوانه‌زنی گردید و نیز بذرها را به آب و گازها نفوذپذیر کرده و هم خروج ریشه‌چه را تسهیل نمود. همچنین افزایش جذب آب سبب تورژسانس و بزرگ شدن سلول‌های ریشه‌چه و ساقه‌چه نسبت به شاهد گردید که این افزایش طول گیاهچه در دمای ۲۵°C مشهودتر است. با وجود اینکه تناوب دمایی سبب افزایش و تسریع در جوانه زنی و سرعت جوانه‌زنی گردید اما بعد از جوانه‌زدن سرما سبب کندی رشد گیاهچه گردید، به طوری که کمترین میزان طول گیاهچه در امواج فراصوتی صفر دقیقه - تناوب دمایی مشاهده گردید.



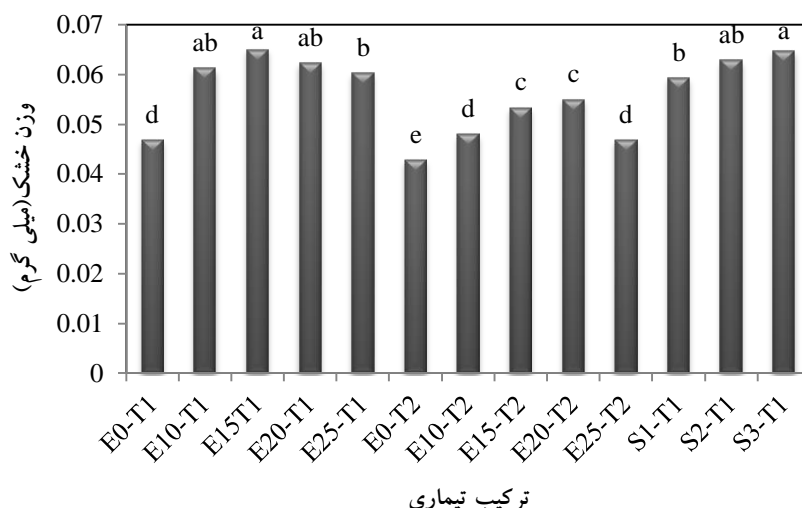
شکل ۴-۱-۱۸ - اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دما بر طول گیاهچه بذر سرخارگل، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: هفته سرمادهی و T: دما.



شکل ۴-۱-۱۹ - اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دما بر طول ریشه چه ، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: هفته سرمادهی و T: دما.

#### ۴-۱-۲۴ وزن خشک گیاهچه در سرخارگل

شکل ۴-۱-۲۰ روند تغییرات اثر تیمارهای امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دما را بر وزن خشک گیاهچه سرخارگل را نشان می‌دهد. پیش تیمار با امواج فراصوتی-دمای جوانه‌زنی و پیش تیمار سرما -دمای ۲۵°C سبب افزایش وزن خشک گیاهچه در اغلب تیمارها نسبت به شاهد گردید؛ بالاترین میزان وزن خشک گیاهچه در تیمار E15T1 و S3T1 با میانگین حدود ۰/۰۶۴ میلی گرم وزن خشک مشاهده شد و کمترین میزان آن نیز در تیمار E0T2 با میانگین ۰/۰۴۲ میلی گرم وزن خشک مشاهده شد که می‌توان هم نقش دما وهم امواج فراصوتی را بر وزن خشک گیاهچه مشاهده نمود. علی‌رغم اثر بارز تناوب دمایی که سبب افزایش جوانه‌زنی بذرها شد چون بذر بعد از سبز شدن به دمای مناسب جهت رشد نیاز دارد، افزایش وزن خشک گیاهچه در تیمارهای S3T1 و S2T1 گویای اثر دما بر رشد گیاهچه می‌باشد. امواج فراصوتی از طریق نفوذپذیری پوسته، بالا بردن دمای بافت‌ها، تسریع در آبنوشی و فعالیت‌های آنزیم های هیدرولیتیکی سبب تسریع در جوانه‌زنی، افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذری و میزان استفاده از ذخایر بذری و افزایش وزن خشک گیاهچه گردید.



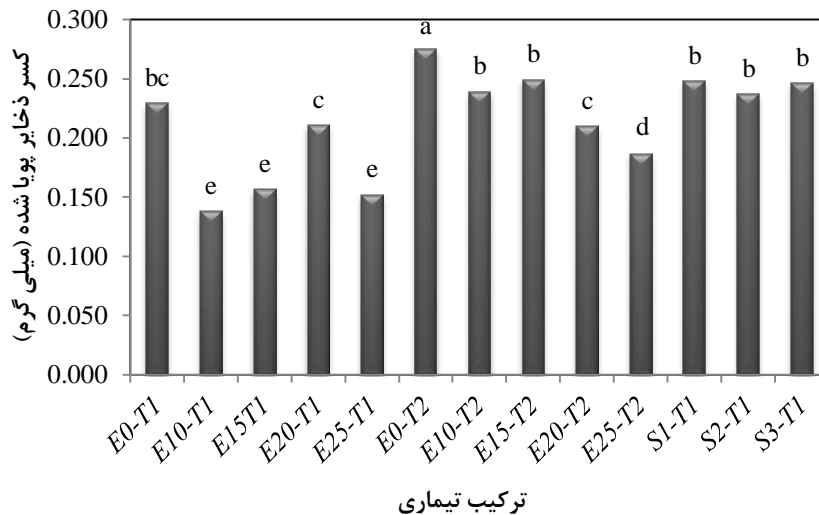
شکل ۴-۱-۲۰- اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر وزن خشک گیاهچه، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: هفته سرمادهی و T: دما.

نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۱-۵ نشان داد که اثر پیش تیمار - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر شاخص قدرت بذری، کسر ذخایر مصرف شده، کارایی استفاده از ذخایر بذری، میزان استفاده از ذخایر بذری و وزن ذخایر بذری در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود.

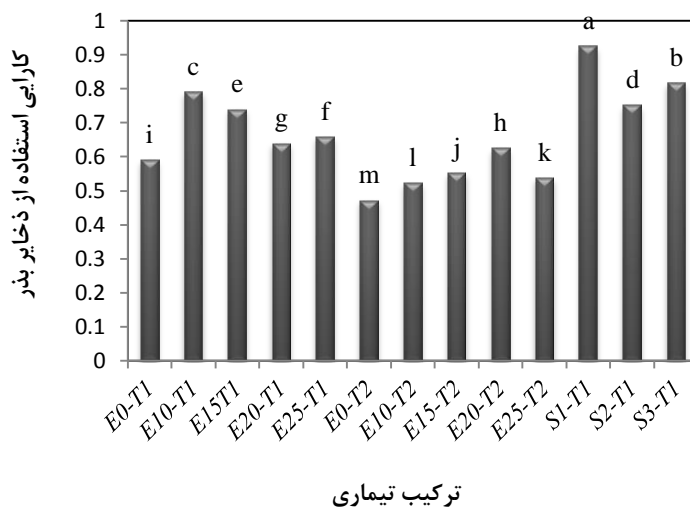
#### ۴-۱-۲۵ کسر ذخایر مصرف شده و کارایی استفاده از ذخایر بذری

شکل ۴-۱-۲۱ روند تغییرات اثر تیمارهای امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما را بر میزان کسر ذخایر پویا شده بذری سرخارگل را نشان می دهد. بالاترین میزان کسر ذخایر مصرف شده در تیمار E0T2 با میانگین ۰/۲۷۵ میلی گرم مشاهده شد. در شکل ۴-۱-۲۲ مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات اثر تیمارهای امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما را بر کارایی استفاده از ذخایر بذری سرخارگل را نشان می دهد. بالاترین میزان کارایی استفاده از ذخایر بذری در تیمار S1T1 با میانگین ۰/۹۳ مشاهده و کمترین میزان آن نیز در تیمار E0T2 با میانگین ۰/۵۲ مشاهده شد. بالا بودن میزان کارایی استفاده از ذخایر در تیمارهای S1T1، E15T1، و S3T1 اثر دمای ۲۵°C را بر سرعت فرآیندهای بیوشیمیایی و رشد گیاهچه نشان می دهد؛ به موازات افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذری، کسر ذخایر مصرف شده نیز کاهش یافت. افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذری نشان دهنده سهم تخصیص بیشتر مواد پویا شده به گیاهچه و به عبارتی بنیه بالاتر بذری جهت تولید گیاهچه‌های نرمال می باشد. کارایی

استفاده از ذخایر بذر تحت تأثیر فراهمی انرژی برای فعالیت‌هایی مانند سنتز پروتئین و ساخت ترکیبات ساختمانی در بافت گیاهچه قرار دارد (۵۲ و ۱۹۸).



شکل ۴-۱-۲۱- اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دما بر کسر ذخایر پویا شده بذر ، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: هفته سرمادهی و T: دما.

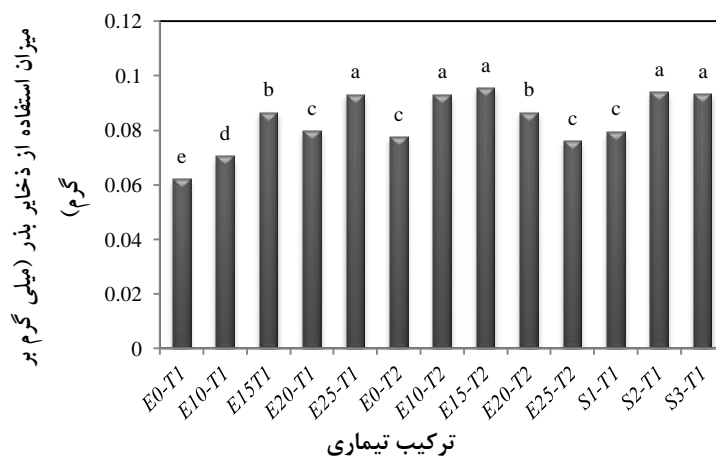


شکل ۴-۱-۲۲- اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیغیکاسیون - دما بر کارایی استفاده از ذخایر بذر ، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: زمان سرمادهی و T: دما.

#### ۴-۱-۲۶ میزان استفاده از ذخایر بذری در سرخارگل

بالاترین میزان استفاده از ذخایر بذری در تیمار E<sub>15</sub>T<sub>2</sub>، E<sub>10</sub>T<sub>2</sub>، E<sub>25</sub>T<sub>1</sub>، S<sub>3</sub>T<sub>1</sub>، S<sub>2</sub>T<sub>1</sub> با میانگین ۰/۰۹۰ و کمترین میزان آن نیز در تیمار E<sub>0</sub>T<sub>1</sub> با میانگین ۰/۰۶۸ میلی گرم بر گرم مشاهده گردید.

افزایش وزن خشک گیاهچه در اثر پیش تیمار با امواج فراصوتی یا استراتیفیکاسیون سرمایی و سپس دمای جوانه‌زنی  $25^{\circ}\text{C}$  توانست میزان پویایی ذخایر بذرها و کارایی ذخایر پویا شده را افزایش دهد. با افزایش میزان ذخایر قابل دسترس میزان قدرت بذر نیز افزایش می‌یابد (۹۴ و ۹۵). میزان استفاده از ذخایر بذری بیشتر وزن خشک باقیمانده‌ی بذری کمتری به جای می‌گذارد؛ به طور کلی وزن خشک باقیمانده بذر معیار مهمی در ارزیابی بنیه بذر جهت تولید گیاهچه‌های نرمال می‌باشد؛ زیرا اساساً کاهش وزن خشک باقیمانده بذر، از طریق تأثیر بر وزن ذخایر پویا شده، منجر به تخصیص بیشتر ماده خشک به گیاهچه و در نتیجه افزایش احتمال تشکیل گیاهچه‌های نرمال می‌شود. از این رو، هر چه وزن خشک باقیمانده بذر کمتر باشد، به مفهوم آن است که درصد بیشتری از ذخایر اولیه بذر تحت تأثیر آنزیم‌های هیدرولیز کننده قرار گرفته است (۲۳، ۵۲ و ۹۴).

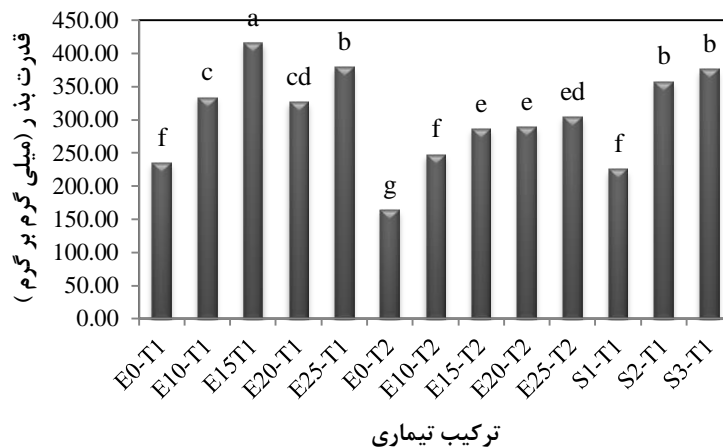


شکل ۴-۱-۲۳- اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر میزان استفاده از ذخایر بذر، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: زمان سرمادهی و T: دما.

#### ۴-۱-۲۷ قدرت بذر در سرخارگل

شکل ۴-۱-۲۴ روند تغییرات اثر تیمارهای امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما را بر قدرت بذر سرخارگل را نشان می‌دهد. بیشترین میزان قدرت بذر در تیمارهای  $E_{15}T_1$  با میانگین حدود  $414/25$  میلی‌گرم در رده‌ی اول و تیمارهای  $E_{25}T_1$ ،  $S_2T_1$  و  $S_3T_1$  در رده‌ی دوم قرار داشتند؛ کمترین میزان آن نیز در تیمار  $E_0T_2$  با میانگین حدود  $213$  میلی‌گرم مشاهده شد. شاخص قدرت بذر معرف

درصد و پتانسیل جوانه‌زنی بوده و هر چه بذر کیفیت بالاتری داشته باشد شاخص قدرت بذر آن افزایش یافته و در نتیجه درصد جوانه‌زنی نهایی نیز افزایش می‌یابد. بالا بودن شاخص قدرت بذر در بذرهایی پیش تیمار شده با امواج فراصوتی را می‌توان به دلیل بالاتر بودن ذخایر و اندوخته پویا نسبت داد. افزایش میزان ذخایر قبل دسترس در بذر میزان قدرت آن‌ها را نیز افزایش می‌دهد (۹۴ و ۹۵). علاوه بر این همپتون و تکرونی (۱۹۹۵) اظهار داشتند که طول گیاهچه معیاری از قدرت بذر محسوب می‌شود و از آن برای ارزیابی رشد گیاهچه و قدرت آن استفاده می‌شود (۱۱۳). پیش تیمار امواج فراصوتی در مدت‌های ۱۰ دقیقه، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه طول ریشه‌چه را بسیار تحت تأثیر قرار داده بود به خصوص در مدت ۱۵ دقیقه بیشترین اثر را هم بر طول ریشه‌چه و هم طول ساقه‌چه گذاشته بود، بنابراین بیشترین قدرت بذر در تیمارهایی که ۱۵ دقیقه پیش تیمار و دمای  $C^{\circ} 25$  به منظور جوانه‌زنی قرار گرفته بودند مشاهده گردید.



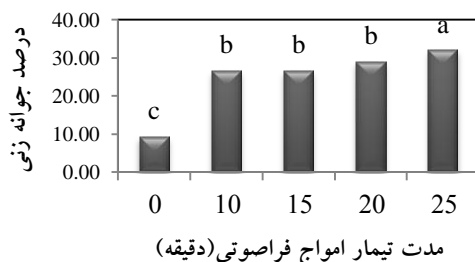
شکل ۴-۱-۲۴- اثر امواج فراصوتی - دما و استراتیفیکاسیون - دما بر قدرت بذر سرخارگل، E: مدت اعمال امواج فراصوتی، S: زمان سرمادهی و T: دما.

نتایج جدول ۴-۱-۶ تجزیه واریانس صفات حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه-

زنی، قند کل و پروتئین محلول بذر استویا را نشان می‌دهد، نتایج نشان داد که تیمار با امواج فراصوتی با احتمال ۹۹ درصد اثر معنی‌داری بر کلیه صفات داشت.

#### ۴-۱-۲۸ درصد جوانه‌زنی استویا

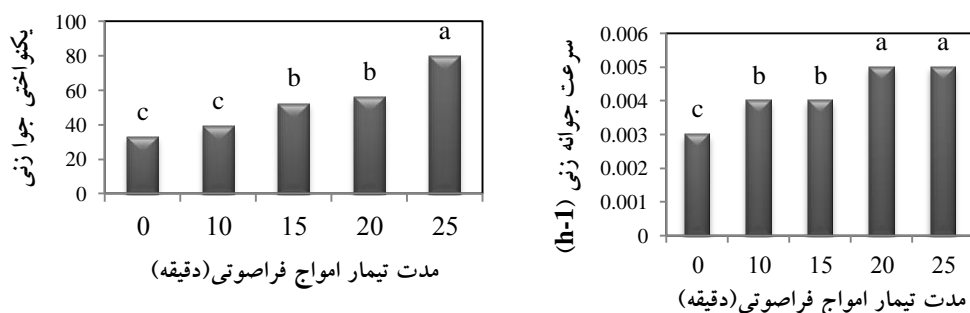
نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۱-۶ نشان داد که تیمار با امواج فراصوتی با احتمال ۹۹ درصد بر میزان درصد جوانه‌زنی اثرگذار بوده است. بیشترین میزان جوانه‌زنی در مدت تیمار ۲۵ دقیقه مشاهده گردید (شکل ۴-۱-۲۵).



شکل ۴-۱-۲۵- اثر پیش تیمار امواج فراصوتی بر درصد جوانه‌زنی بذر استویا،  $LSD=2/4$

#### ۴-۱-۲۹ سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی استویا

شکل ۴-۱-۲۶ سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی بذر استویا را تحت اثر پیش تیمار امواج فراصوتی نشان می‌دهد. مدت پیش تیمار ۲۰ و ۲۵ دقیقه بیشترین میزان سرعت جوانه‌زنی را نشان داد و بیشترین میزان یکنواختی جوانه‌زنی نیز در تیمار ۲۵ دقیقه تیمار با امواج فراصوتی مشاهده شد.



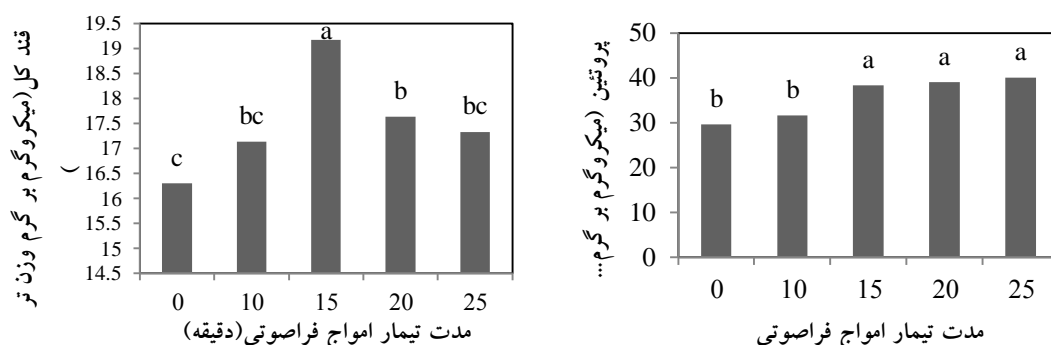
شکل ۴-۱-۲۶- اثر پیش تیمار با امواج فراصوتی بر سرعت جوانه‌زنی  $LSD=0/0002$  و یکنواختی جوانه-

زنی،  $LSD=9/4$



## ۴-۱-۳۰ قند کل و پروتئین محلول استویا

شکل ۴-۱-۲۷ نتایج مقایسه‌ی میانگین اثر پیش تیمار امواج فراصوتی بر میزان قند کل و پروتئین محلول را نشان می‌دهد. امواج فراصوتی سبب افزایش قند کل در همه‌ی تیمارها و پروتئین محلول در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد گردید.



شکل ۴-۱-۲۷ اثر پیش تیمار با امواج فراصوتی بر قند کل  $LSD=1/2$  و پروتئین محلول بذر استویا،  $3/5$   
 $LSD=$

پیش تیمار امواج فراصوتی در همه‌ی صفات مورد بررسی در بذر استویا وضعیت مطلوبی را در گیاهچه سبب شده بود، اما تعیین زمان مطلوب امواج فراصوتی چه اندازه‌ی زمانی باشد و در چه زمانی در اکثر صفات مورد بررسی در حالت بهینه صفت مورد بررسی رخ داده است بسیار حائز اهمیت می‌باشد بهترین زمان ۲۵ دقیقه پیش تیمار با امواج فراصوتی برای بذر استویا بود.

## ۴-۱ نتیجه‌گیری کلی

پیش تیمار با امواج فراصوتی در مدت‌های انجام شده در بیشتر موارد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی اندازه‌گیری شده و افزایش میزان قندهای محلول گردید که بدنبال آن حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه افزایش یافته بود. فعالیت آنتی‌اکسیدان-ها آنزیمی اندازه‌گیری شده در گیاهچه پیش تیمار شده با امواج فراصوتی افزایش یافت. در مطالعاتی که استفاده از پیش تیمار با امواج فراصوتی جهت بهبود خصوصیات جوانه‌زنی صورت گرفته بود به ندرت بررسی

مکانیزم‌ها بیوشیمیایی جوانه‌زنی و یا در مقایسه با روش‌های دیگر بهبود جوانه‌زنی صورت گرفت. پیش تیمار با امواج فراصوتی در مدت‌های مختلف و سپس جوانه‌زنی در دماهای مختلف و نیز پیش تیمار استراتیغیکاسیون سرمایی و دمای جوانه‌زنی  $25^{\circ}C$  توانست در بیشتر تیمارها درصد جوانه‌زنی، و سرعت جوانه‌زنی را نسبت به شاهد افزایش دهد. امواج فراصوتی قدرت بذر، بذرهای گیاهان مختلف را افزایش می‌دهد، اما شرایط بهینه پیش تیمار در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. برای سرخارگل در قدرت ۵۰ وات و مدت زمان ۱۵ دقیقه بهترین نتایج خصوصیات جوانه‌زنی و بیوشیمیایی بدست آمد. از طرف دیگر با افزایش فعالیت آنزیم‌های جوانه‌زنی و شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تأثیر امواج فراصوتی، امواج فراصوتی می‌تواند به عنوان محرک و نیروی اولیه جوانه‌زنی، افزایش بنیه و تسریع در جوانه‌زنی بذرهای گیاهان استفاده شود. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش پیشنهادات ذیل جهت تحقیقاتی آتی پیشنهاد می‌گردد:

#### ۴-۱ پیشنهادات

- ۱- بررسی میزان فعالیت همه‌ی آنزیم‌های مورد بررسی در چند بازه‌ی زمانی بعد از آبنوشی بذر تا جوانه‌زنی بذر سرخارگل و مرحله‌ی گیاهچه‌ای.
- ۲- بررسی سرعت سبز شدن و نمو فنولوژیک در تیمار امواج فراصوتی و شاهد در مزرعه مبتنی بر مدل‌سازی مراحل مختلف رشدی.

## ۲-۴ نتایج و بحث ارزیابی مدل‌های رگرسیونی

### ۱-۲-۴ اثرات دما و پتانسیل آب بر درصد جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی در ۵۰ درصد جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی، زمان رسیدن به ۱۰٪ (D<sub>10</sub>)، ۵۰٪ (D<sub>50</sub>) و ۹۰٪ (D<sub>90</sub>) جوانه‌زنی (جدول ۱-۲-۴) نشان داد که تأثیر دما، پتانسیل آب و اثرات متقابل دما و پتانسیل آب بر بیشتر صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۱-۲-۴ نتایج تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی، زمان رسیدن به

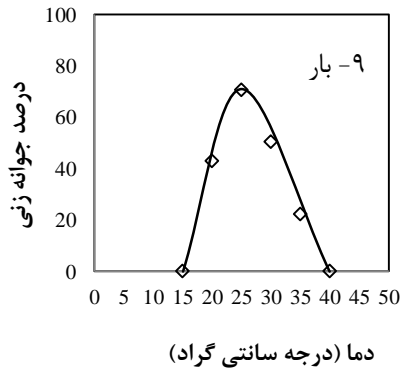
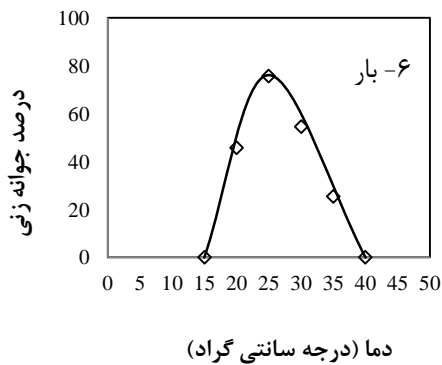
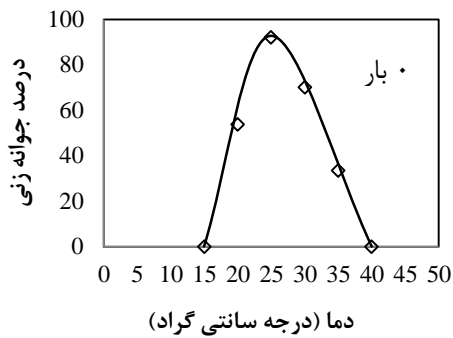
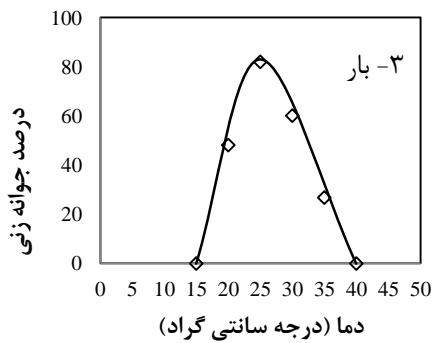
۱۰٪ (D<sub>10</sub>)، ۵۰٪ (D<sub>50</sub>) و ۹۰٪ (D<sub>90</sub>) درصد جوانه‌زنی

میانگین مربعات						
D <sub>90</sub>	GU	D <sub>10</sub>	R50	Gmax	df	منابع تغییر
۱۰۳۷**	۵۱۴**	۶۵۲/۷**	۰/۰۰۰۰۲**	۲۶۱**	۵	دما
۱۶۹۸۵۲**	۶۳۳۲۰۰**	۵۲۴۳**	۰/۰۰۰۱**	۱۳۷۴۵**	۳	پتانسیل آب
۴۴۵۲**	۵۷۶**	۲۰۷۸**	۰/۰۰۰۱**	۷۹/۷**	۱۵	اثر متقابل
۵۳/۷	۴۱۳	۲۴/۸	۰/۰۰۰۰۰۱	۳/۴	۴۸	خطا

\*\*\*، \*\* و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

در پتانسیل صفر بار با افزایش دما از ۱۵ °C به ۲۵ °C درصد جوانه‌زنی تقریباً به صورت خطی افزایش یافت و در ۲۵ °C به حداکثر میزان خود (۹۲ درصد) رسید اما در دماهای کمتر از ۲۰ °C و بیشتر از ۳۵ °C، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت و در دماهای ۱۵ °C و ۴۰ °C به صفر رسید. در پتانسیل ۳- بار در دامنه دمایی ۱۵ °C تا ۲۵ °C درصد جوانه‌زنی تقریباً به صورت خطی افزایش یافت و در دمای ۱۵ °C، درصد جوانه‌زنی تقریباً ۸۱ درصد بود. در پتانسیل ۶- بار در دامنه دمایی ۱۵ °C تا ۲۵ °C تقریباً به صورت خطی افزایش یافت و در دمای ۲۵ °C، درصد جوانه‌زنی تقریباً ۷۵٪ بود. در پتانسیل ۹- بار در دامنه دمایی ۱۵ °C تا ۲۵ °C تقریباً به صورت خطی افزایش یافت و در دمای ۲۵ °C، درصد جوانه‌زنی

تقریباً ۸۰/۳ درصد بوده اما در دماهای کمتر از  $20^{\circ}\text{C}$  و بیشتر از  $35^{\circ}\text{C}$ ، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت و در دماهای  $15^{\circ}\text{C}$  و  $40^{\circ}\text{C}$  به صفر رسید. به طوری که این دامنه دمایی در پتانسیل‌های صفر، ۳-، ۶- و ۹- بار همان‌طور که در شکل ۴-۲-۱ مشاهده می‌شود، با کاهش پتانسیل آب، درصد جوانه‌زنی حداکثر کاهش یافت، محققین در گیاهان مختلف گزارش کردند که دما و پتانسیل از عوامل بسیار تأثیرگذار بر حداکثر جوانه‌زنی می‌باشد. گزارش شده است که دما و پتانسیل آب بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی کدو تخم کاغذی، سیاه دانه و گاوزبان تأثیر معنی‌دار داشته و با کاهش پتانسیل آب، درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت. همچنین، با افزایش دما تا دمای مطلوب، درصد و سرعت جوانه‌زنی افزایش و بعد از آن کاهش می‌یابد، اما حساسیت این مؤلفه‌ها به پتانسیل آب بیشتر از دما بود. وی نشان داد با کاهش پتانسیل آب، دامنه دمایی ( $T_c-T_b$ ) کاهش یافت. که این میزان در پتانسیل صفر برای کدو تخم کاغذی، سیاه دانه و گاوزبان به ترتیب  $38^{\circ}\text{C}$ ،  $30^{\circ}\text{C}$  و  $35^{\circ}\text{C}$  و در پتانسیل ۸- بار به ترتیب  $35^{\circ}\text{C}$ ،  $15^{\circ}\text{C}$  و  $20^{\circ}\text{C}$  بود (۴). واکنش درصد سبز شدن سورگوم، به افزایش دما در پتانسیل‌های مختلف آب متفاوت است (۴۲)، به طوری که در پتانسیل  $0/2-$  مگا پاسکال، بین دماها از لحاظ درصد جوانه‌زنی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت اما در پتانسیل  $0/4-$  مگا پاسکال، با افزایش دما درصد سبز شدن به طور خطی افزایش یافت (۴۲). به طور کلی سرعت جوانه‌زنی، به صورت خطی با قابلیت دسترسی به آب افزایش می‌یابد (۱۰۸) و درصد جوانه‌زنی با کاهش پتانسیل آب کاهش می‌یابد (۱۰۷). دلیل کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی در دماهای بحرانی را می‌توان به اثر دمای بالا بر غشاهای پراکسیداسیون لیپید و دناتور شدن پروتئین‌ها بعنوان مهمترین عوامل پیشنهاد نمود. تغییر در ترکیبات غشایی می‌تواند بر نقل و انتقالات لیپیدها یا پویایی مولکول‌های غشایی اثرگذار باشند (۱۲۲).



شکل ۴-۲-۱- تأثیر دما بر درصد جوانه زنی در پتانسیل‌های مختلف آب

#### ۴-۲-۲ اثرات دما و پتانسیل آب بر سرعت جوانه زنی

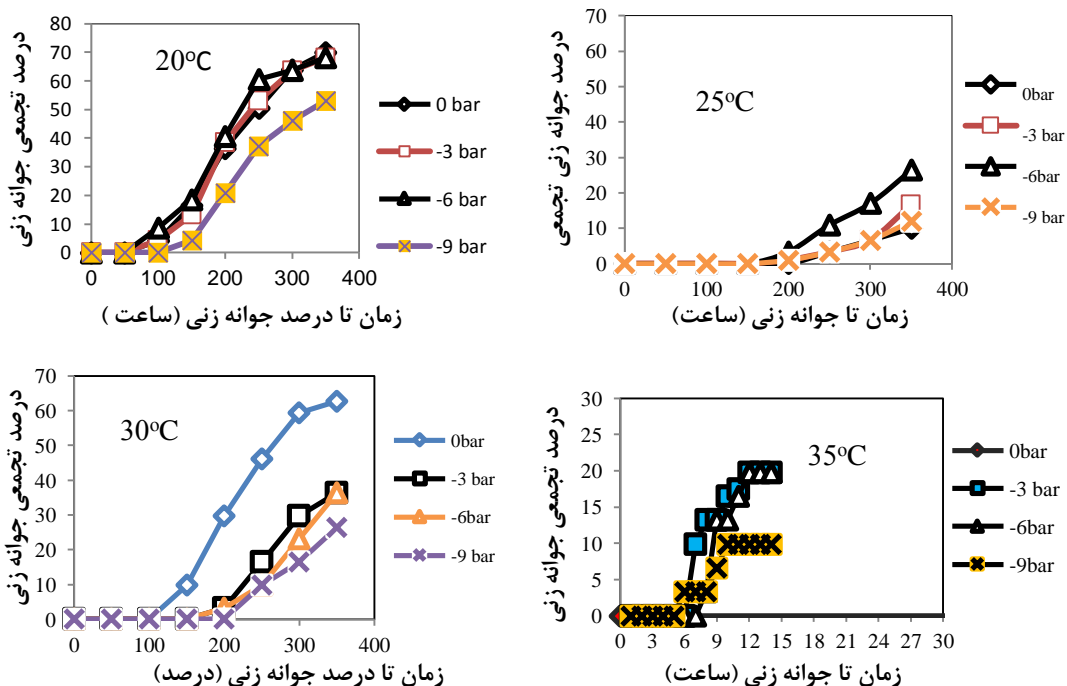
نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تأثیر پتانسیل آب، دما و اثر متقابل آن‌ها بر یکنواختی، سرعت و زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ و ۹۰ درصد جوانه زنی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۲-۱). با کاهش پتانسیل آب از ۰ به ۹- بار زمان تا رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد جوانه زنی افزایش می‌یابد. با افزایش دما تا دمای مطلوب جوانه زنی زمان رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد جوانه زنی کاهش (این زمان‌ها برای پتانسیل‌های ۰، ۳-، ۶- و ۹- در ۲۵ °C به ترتیب ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۴۴ ساعت بوده) و پس از آن با افزایش دما به بالاتر از دمای مطلوب این زمان‌ها افزایش یافت زمان رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد جوانه زنی برای پتانسیل‌های ۰، ۳-، ۶- و ۹- در ۳۵ °C ۱۹۲ ساعت بوده است.

#### ۴-۲-۳ اثرات دما و پتانسیل آب بر یکنواختی جوانه زنی

یکنواختی جوانه زنی زمان لازم برای رسیدن میزان جوانه زنی از ۱۰ به ۹۰ درصد می‌باشد که کاهش این زمان نشان دهنده افزایش یکنواختی است. نتایج نشان داد که با کاهش پتانسیل آب یکنواختی

جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. در واقع زمان رسیدن از ۱۰ درصد جوانه‌زنی به ۹۰ درصد آن با افزایش خشکی روندی افزایشی داشته به طوری که این مقدار در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  در پتانسیل‌های صفر و -۹ به ترتیب ۸۵ و ۱۳۱ ساعت بود. به طور کلی با کاهش پتانسیل آب زمان جوانه‌زنی در گیاه سرخارگل افزایش و یکنواختی در آن کاهش یافت که این موضوع ناشی از کاهش سرعت جوانه‌زنی تحت تأثیر تنش خشکی می‌باشد. کاهش سرعت جوانه‌زنی به دلیل جذب سخت‌تر و کندتر آب توسط بذر در شرایط تنش خشکی در ارقام مختلف پنبه توسط (۳۱)، در گندم (۵۳) و جو (۱۳) گزارش شده است.

در همه دماها با کاهش پتانسیل آب، حداکثر درصد جوانه‌زنی کاهش و زمان رسیدن به آن افزایش می‌یابد اما میزان این تغییرات در همه دماها یکسان نیست به طوری که با افزایش دما تا دمای مطلوب میزان تغییرات کاهش یافته و در دمای مطلوب به حداقل خود می‌رسد و سپس با افزایش دما این تغییرات افزایش می‌یابند. در هر پتانسیل آب با افزایش دما از  $20^{\circ}\text{C}$  به  $25^{\circ}\text{C}$ ، زمان رسیدن به حداکثر درصد جوانه‌زنی کاهش و سپس با ادامه افزایش دما از  $25^{\circ}\text{C}$  به  $35^{\circ}\text{C}$ ، افزایش می‌یابد.



شکل ۴-۲-۲- درصد جوانه‌زنی تجمعی در دماهای از پتانسیل‌های آب در دماهای  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $25^{\circ}\text{C}$  و  $30^{\circ}\text{C}$  در برابر زمان تا درصد جوانه‌زنی بر حسب ساعت

## ۲-۴-۴ مقایسه مدل‌های مختلف رگرسیونی در کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه-

### زنی به دما در پتانسیل‌های مختلف آب

در این مطالعه برای کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی به دما در پتانسیل‌های مختلف آب از مدل‌های دوتکه‌ای، دندان‌مانند و بتای اصلی استفاده شد. که مدل بتای اصلی مناسب نبود. در مدل دوتکه‌ای دمای پایه، دمای مطلوب، دمای سقف و ساعت بیولوژیک جوانه‌زنی با استفاده از مدل برآورد می‌شود اما مدل دندان‌مانند دمای مطلوب را در یک دامنه دمایی (از دمای مطلوب تحتانی تا دمای مطلوب فوقانی) برآورد می‌کند. معیارهای مورد نظر در مقایسه مدل‌های مختلف برای انتخاب مدل برتر در توصیف سرعت جوانه‌زنی به دما در پتانسیل‌های مختلف آب شامل مجذور میانگین مربعات انحراف (RMSE)، ضریب تبیین ( $R^2$ )، رابطه زمان (ساعت) تا جوانه‌زنی مشاهده شده و پیش بینی شده است (جدول ۴-۲-۲). با مقایسه معیارهای تعیین مدل برتر این نتایج حاصل گردید:

۱- ضریب رگرسیون a (میزان انحراف خط رگرسیون از مبدأ مختصات) در مدل‌های دندان‌مانند و دوتکه‌ای در پتانسیل‌های ۰، -۳، -۶، -۹ بار در سطح ۱ درصد معنی‌دار است و ضریب b (میزان اریب خط رگرسیون از خط ۱:۱) و در مدل‌های دندان‌مانند و دوتکه‌ای در همه پتانسیل‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۴-۲-۲).

۲- ضریب تبیین ( $R^2$ ) در مدل دوتکه‌ای بسیار پایین‌تر از مدل دندان‌مانند به طور متوسط  $۸۲/۳$  و  $۷۹/۷$  درصد است (جدول ۴-۲-۲).

۳- مجذور میانگین مربعات انحراف (RMSE) برای زمان جوانه‌زنی و ضریب تغییرات (CV) در مدل دوتکه‌ای بسیار پایین‌تر از مدل دندان‌مانند می‌باشد. (جدول ۴-۲-۲).

۴- پراکندگی نقاط در اطراف خط یک به یک، در مدل دندان‌مانند کمتر از مدل دوتکه‌ای است (شکل‌های ۴-۲-۶ و ۴-۲-۷).

با در نظر گرفتن موارد ذکر شده، مدل دوتکه‌ای به عنوان مدل برتر انتخاب شد (شکل‌های ۴-۲-۴، ۴-۲-۵، ۴-۲-۶ و ۴-۲-۷). معیار مناسب برای تعیین برازش مدل در جوانه‌زنی، زمان تا جوانه‌زنی است که مقدار جزئی خطای مدل در تعیین سرعت جوانه‌زنی، اشتباه به نسبت خیلی بزرگتری در زمان تا جوانه‌زنی در دماهای پایین ایجاد می‌کند (۴۲). محققین در گیاهان مختلف، از توابع رگرسیونی در کمی‌سازی سرعت جوانه‌زنی استفاده کردند. در ارزیابی مدل‌های رگرسیون غیرخطی، در سه گیاه دارویی کدو تخم کاغذی، سیاه‌دانه و گاو زبان، گزارش شده است که مدل دندان‌مانند بهتر از مدل‌های دیگر، واکنش سرعت جوانه‌زنی به دما را در این گیاهان توصیف می‌کند (۴). در تحقیقی مشابه بر روی گندم، گزارش شده است که مدل دندان‌مانند بهتر از مدل‌های دیگر، واکنش سرعت جوانه‌زنی به دما را توصیف می‌کند (۳۴).

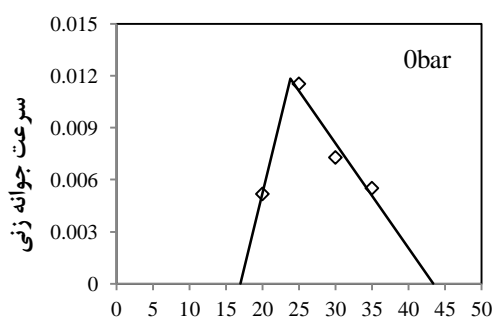


جدول ۲-۲-۴ جذر میانگین مربعات اشتباه (RMSE)، ضریب تغییرات (CV)، ضریب تبیین ( $R^2$ ) و ضرایب

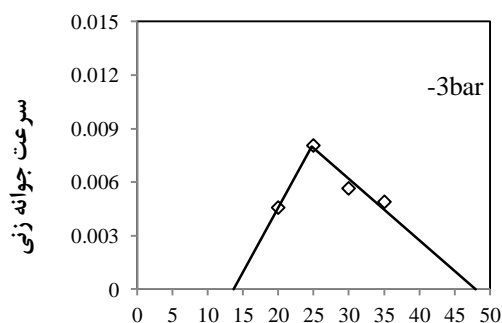
رگرسیون (a و b) برای مدل‌های مختلف رگرسیونی در پتانسیل‌های مختلف آب (RMSE)

$b \pm SE$	$a \pm SE$	$R^2$	CV	RMSE	W
مدل دوتکه‌ای					
$-0.00005^{**} \pm 0.000004$	$0.157 \pm 0.0006$	0.94	8/97	0.00066	0
$-0.00003^{**} \pm 0.000004$	$0.111 \pm 0.0008$	0.83	1/74	0.00062	-3
			0		
$-0.00002^{**} \pm 0.000005$	$0.009 \pm 0.0010$	0.60	1/82	0.00078	-6
			3		
$-0.00003^{**} \pm 0.000003$	$0.12^{**} \pm 0.0006$	0.92	7/97	0.00049	-9
مدل دندان مانند					
$1/0.117^{**} \pm 0.1140$	$-1/2655 \pm 17/86$	0.88	1/33	17/108	0
			1		
$0.8661^{**} \pm 0.1419$	$23/4921^{**} \pm 26/38$	0.78	1/58	19/145	-3
			0		
$0.6327^{**} \pm 0.1618$	$65/1850^{**} \pm 30/47$	0.60	1/09	21/96	-6
			2		
$0.9698^{**} \pm 0.0784$	$4/8188^{**} \pm 13/91$	0.93	6/46	11/13	-9

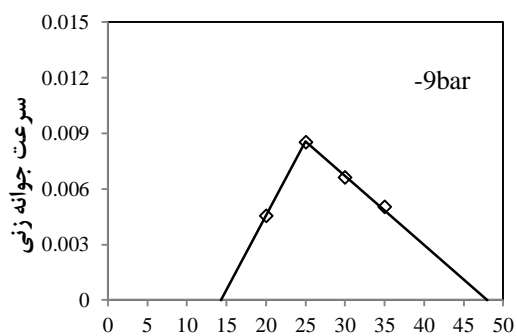
\* و \*\* در a نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با صفر و در b نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با 1 است.



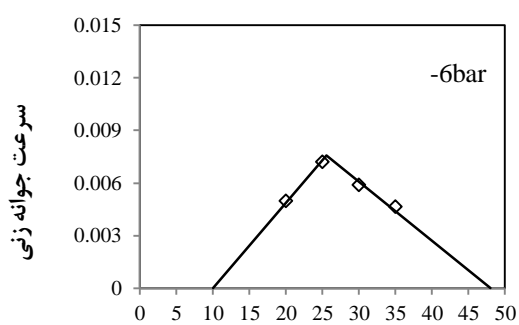
دما (درجه سانتی گراد)



دما (درجه سانتی گراد)

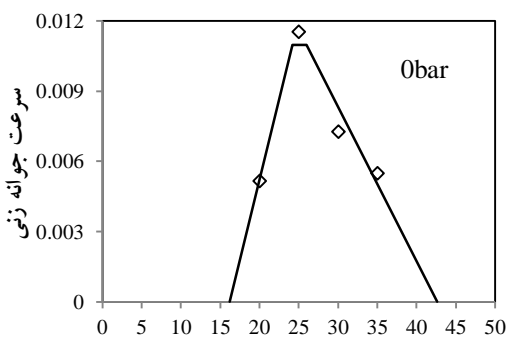


دما (درجه سانتی گراد)

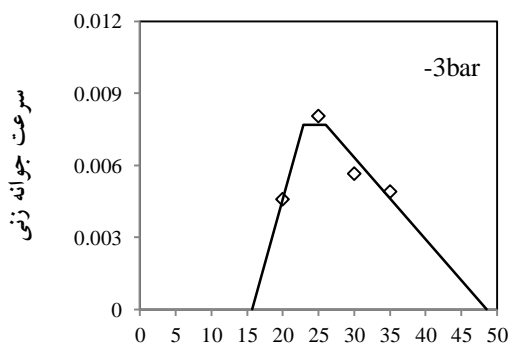


دما (درجه سانتی گراد)

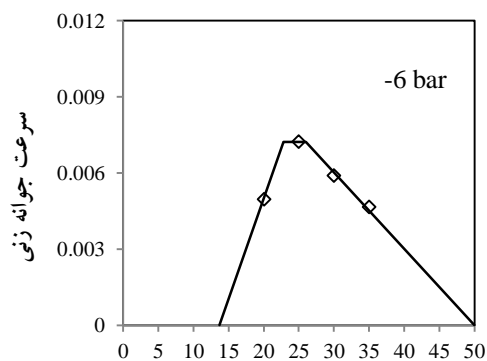
۳-۲-۴- رابطه سرعت جوانه‌زنی با دما در پتانسیل‌های مختلف آب با استفاده از مدل دو تکه ای (S)



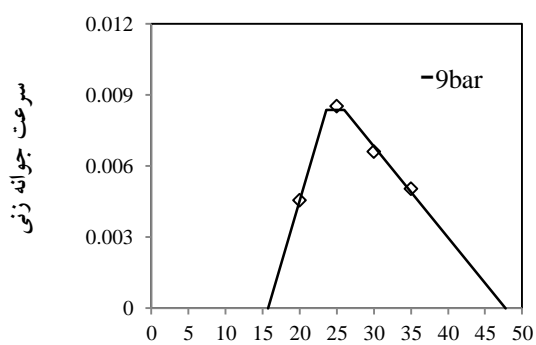
دما (درجه سانتی گراد)



دما (درجه سانتی گراد)



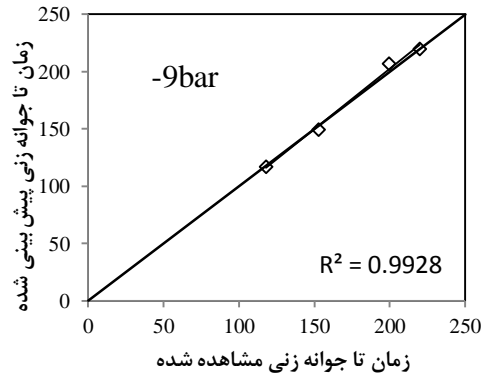
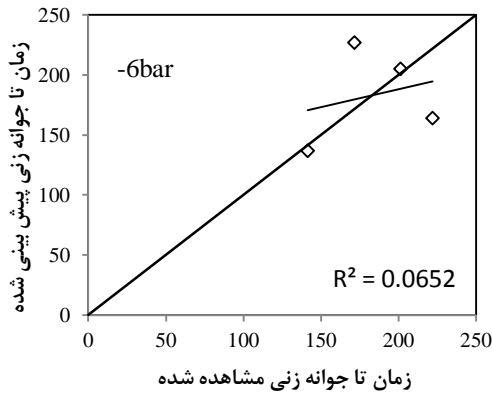
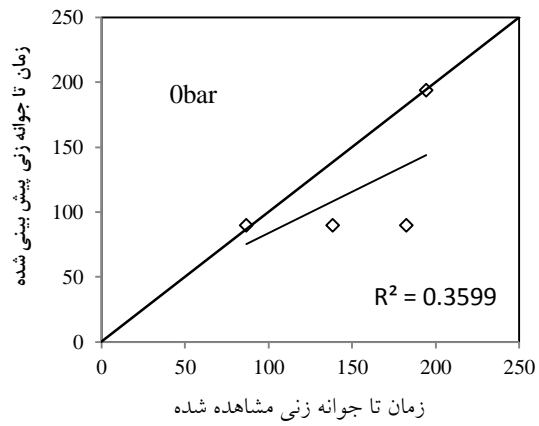
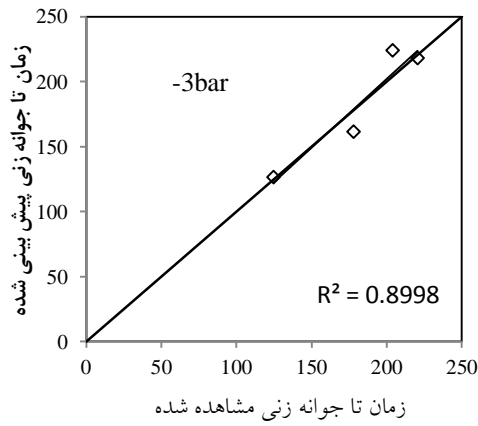
دما (درجه سانتی گراد)



دما (درجه سانتی گراد)

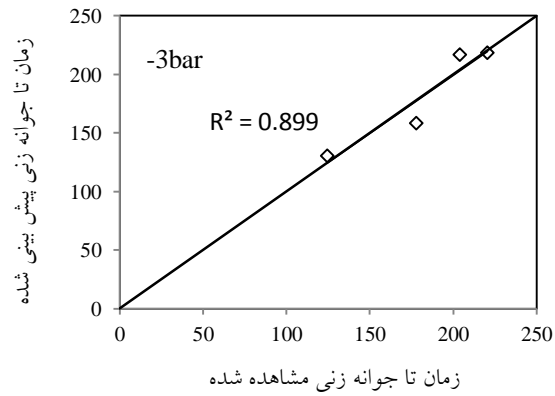
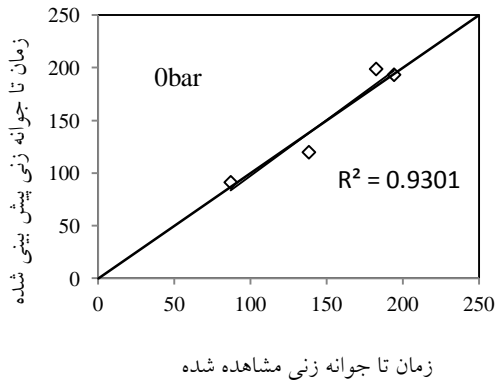
شکل ۴-۲-۴- رابطه سرعت جوانه‌زنی با دما در پتانسیل‌های مختلف آب با استفاده از مدل دندان

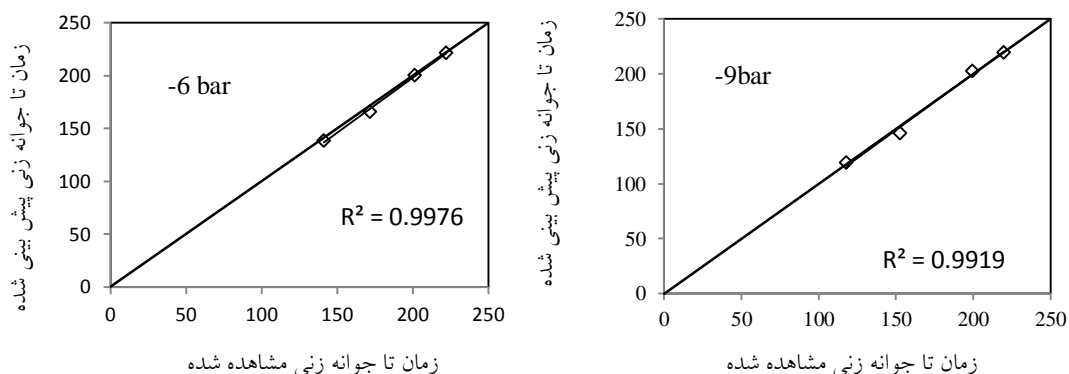
مانند (D).



شکل ۴-۲-۵- زمان (ساعت) تا جوانه زنی پیش بینی شده با استفاده از تابع دوتکه‌ای در برابر مقادیر

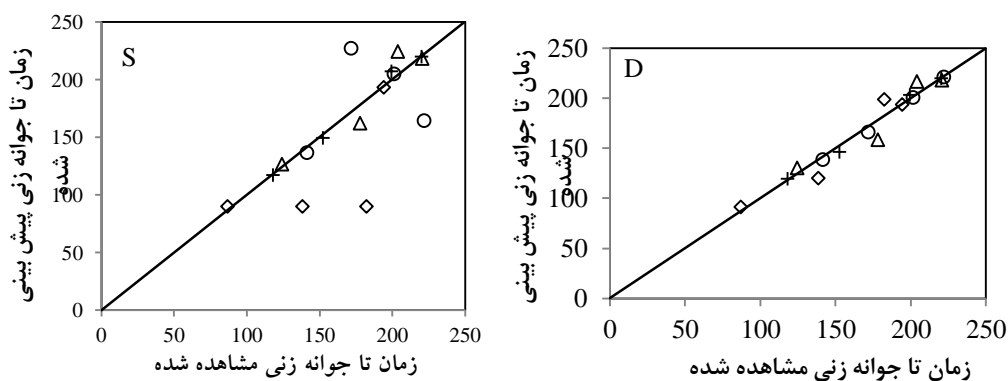
#### مشاهده شده در پتانسیل‌های مختلف آب





شکل ۴-۲-۶- زمان (ساعت) تا جوانه‌زنی پیش‌بینی شده با استفاده از توابع دندان مانند در برابر مقادیر مشاهده شده در پتانسیل‌های مختلف آب

شده در پتانسیل‌های مختلف آب



شکل ۴-۲-۷- زمان (ساعت) تا جوانه‌زنی پیش‌بینی شده با استفاده از توابع دندان مانند (D) و دوتکه-ای (S) در برابر مقادیر مشاهده شده در پتانسیل‌های مختلف آب (اعداد داخل شکل‌ها مربوط به پتانسیل آب بر حسب بار است).

#### ۴-۲-۵ تعیین دماهای کاردینال (پایه، مطلوب و سقف) جوانه‌زنی و بررسی اثر

##### پتانسیل آب بر آن‌ها

در هر دو مدل برای ۵۰ درصد جوانه‌زنی با کاهش پتانسیل آب تعداد ساعت بیولوژیک به طور معنی‌دار افزایش پیدا کرد (جدول ۴-۲-۳). در ۵۰ درصد جوانه‌زنی در پتانسیل ۰ بار یا شاهد در مدل برتر یا دو تکه‌ای دمای پایه برابر با  $17/02^{\circ}\text{C}$ ، دمای مطلوب  $23/8^{\circ}\text{C}$  و دمای سقف  $43/3^{\circ}\text{C}$  است. همچنین، تعداد ساعت بیولوژیک  $84/5$  ساعت بود. دماهای کاردینال در ۱۰ و ۹۰ درصد جوانه‌زنی در هیچ یک از مدل‌ها تحت تأثیر پتانسیل آب قرار نگرفت (جدول ۴-۲-۳). در تحقیقات بسیاری دماهای

کاردینال بسیاری از گیاهان زراعی گزارش شده است. در بررسی جوانه‌زنی ۱۲ رقم گندم، گزارش شده است که دمای پایه ارقام مورد مطالعه از ۲ °C تا ۲/۹ °C، دمای مطلوب از ۳۱/۸ °C تا ۳۲/۲ °C و دمای سقف از ۳۸/۱ °C تا ۴۲/۱ °C متغیر بود (۲۰۰).

جدول ۴-۲-۳ برآورد دمای پایه ( $T_b$ )، دمای مطلوب ( $T_o$ )، مطلوب تحتانی ( $T_{o1}$ )، دمای مطلوب فوقانی ( $T_{o2}$ )، دمای سقف ( $T_c$ ) تعداد ساعت بیولوژیک ( $F_o$ ) برای ۵۰٪ جوانه‌زنی با استفاده از مدل‌های رگرسیونی در پتانسیل‌های مختلف آب ( $W$ ).

مدل	W	$T_b$	$T_o$	$T_c$	$F_o$
دو تکه‌ای					
۰	-	۱۷/۰۲ ± ۰/۵	۲۳/۸ ± ۰	۴۳/۳ ± ۱/۴	۸۴/۵ ± ۳/۳
-۳	-	۱۳/۶ ± ۱/۰۸	۲۴/۷ ± ۶۰	۴۵ ± ۰	۱۲۵/۲ ± ۳/۵
-۶	-	۱۰ ± ۰	۲۵/۵۷ ± ۰/۷۵	۴۸ ± ۰	۱۳۱/۸ ± ۵/۶
-۹	-	۱۴/۳۳ ± ۰/۷۸	۲۴/۹ ± ۰	۴۸ ± ۰	۱۱۶/۹ ± ۲/۷
دندان مانند	$T_b$	$T_{o1}$	$T_{o2}$	$T_c$	$F_o$
۰	۱۶/۲ ± ۰/۷۸	۲۴/۲ ± ۰	۲۶ ± ۰	۴۲/۶ ± ۱/۵	۹۱/۲ ± ۳/۸
-۳	۱۵/۷ ± ۰/۹	۲۲/۹ ± ۰	۲۶ ± ۰	۴۸/۵ ± ۲/۹	۱۳۰ ± ۵/۲
-۶	۱۳/۶۹ ± ۲/۰۱	۲۲/۸۴ ± ۰	۲۶ ± ۰	۵۰ ± ۰	۱۳۸/۴ ± ۰/۰۹
-۹	۱۵/۷ ± ۰/۶۷	۲۳/۶ ± ۰	۲۶/۰ ± ۰	۴۷/۸ ± ۲/۱	۱۱۹/۳ ± ۳/۷

در درجه حرارت مطلوب فعالیت آنزیم‌ها و به تبع آن کارایی واکنش‌های آنزیمی افزایش می‌یابد که این امر بهبود درصد و سرعت جوانه‌زنی را به دنبال دارد. از طرف دیگر درجه حرارت‌های خیلی کم و خیلی زیاد نیز موجب غیرفعال شدن برخی آنزیم‌ها و کاهش سرعت این واکنش‌ها و در نتیجه کاهش درصد جوانه‌زنی می‌شود (۷۰). در دماهای کم فعالیت متابولیکی به طور نسبی کاهش می‌یابد و واکنش-بیوشیمیایی با سرعت کندتری انجام می‌گیرد. و از طرف دیگر دماهای زیاد برای مدت زمان طولانی موجب تخریب پروتئین‌ها و در نهایت از بین رفتن بذر می‌شوند. انعقاد پروتئین و اختلال در کار غشاها

از جمله عواملی هستند که موجب کاهش سرعت جوانه‌زنی بذرها در دماهای پایین می‌شوند. کاهش سرعت جوانه‌زنی نیز به دلیل جذب سخت‌تر و کندتر آب توسط بذر در شرایط تنش خشکی می‌باشد. این نتیجه قبلاً در ارقام مختلف پنبه (۳۱)، در گندم (۵۳) و در جو (۱۳) گزارش شده است.

#### ۴-۲ نتیجه‌گیری و پیشنهادات

به طور کلی می‌توان نتایج این تحقیق را به صورت زیر خلاصه کرد:

۱- دما و پتانسیل آب بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی گیاه سرخارگل تأثیر معنی‌داری داشت. با کاهش پتانسیل آب، درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت. با افزایش دما تا دمای مطلوب درصد و سرعت جوانه‌زنی افزایش و بعد از آن کاهش یافت، اما حساسیت این مؤلفه‌ها به پتانسیل آب بیشتر از دما بود. حساسیت درصد جوانه‌زنی به دما کمتر از سرعت جوانه‌زنی بود. به طوری که در دامنه گسترده‌تری از دماها درصد جوانه‌زنی ثابت بود.

۲- مدل دوتکه‌ای به عنوان مدل برتر در کمی‌سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی به دما و پتانسیل آب انتخاب شد. دماهای کاردینال حاصله عبارت بودند از دمای پایه  $17/02^{\circ}C$ ، دمای مطلوب  $23/8^{\circ}C$  و دمای سقف  $43/3^{\circ}C$ . تعداد ساعت بیولوژیک برای جوانه‌زنی در پتانسیل صفر  $84/5$  ساعت بود. در تکمیل این مطالعه پیشنهاد می‌شود:

۱- رابطه بین درصد جوانه‌زنی و یا سبز شدن با زمان تا جوانه‌زنی و سبز شدن در شرایط متنوع‌تری بررسی شود. در صورتی که رابطه معنی‌داری یافت گردد اهمیت زیادی برای پیش‌بینی درصد جوانه‌زنی و سبز شدن خواهد داشت.

۲- پیشنهاد می‌شود توابع مطلوب تشخیص داده شده در این مطالعه به همراه یک زیر مدل موازنه آب و خاک به کار گرفته شوند تا یک مدل پیش‌بینی سبز شدن برای شرایط مزرعه بدست آید و توانایی این مدل در پیش‌بینی سبز شدن در مورد ارزیابی قرار گیرد.

## ۳-۴ اثر سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید بر روند تغییرات فنلی سرخارگل

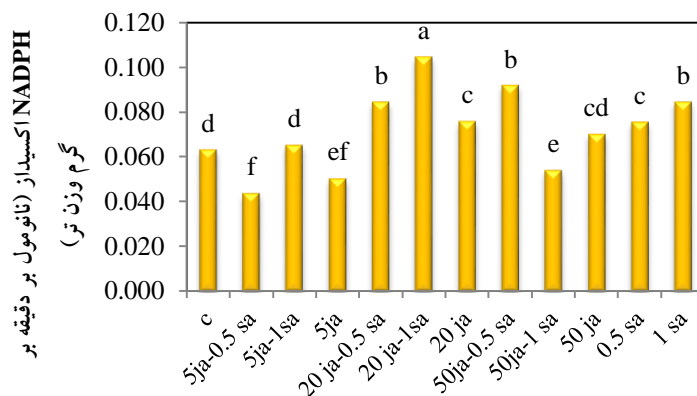
### و استویا

## ۱-۳-۴ نتایج و بحث آزمایشات مزرعه‌ای سرخارگل

تجزیه واریانس جدول ۳-۴-۱ پیوست نشان داد که محلول پاشی بر فعالیت NADPH اکسیداز، غلظت پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپید، فعالیت SOD و CAT در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود.

## ۱-۱-۳-۴ فعالیت NADPH اکسیداز

نتایج مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در شکل ۳-۴-۱ ارائه شده است. محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در ۶ تیمار بیشتر از شاهد شد؛ بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 20ja-1Sa با میانگین ۰/۱ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. سنتز رادیکال سوپراکسید در سطح خارج سلولی غشای پلاسمایی صورت می‌گیرد، انتقال الکترون از NADPH به پذیرنده‌ی الکترون در سطح خارجی غشای سلولی انجام می‌شود. با آزاد شدن پرتون‌ها به سیتوسول، سیتوسول اسیدی می‌گردد و بدنال آن غشای پلاسمایی نامتعادل می‌گردد. این وقایع ناشی از اشتراک انتقال پیام و تقویت اثر محرک می‌باشد (۷۱، ۱۴۵، ۱۴۷ و ۱۵۴). فعالیت NADPH اکسیداز در این زمینه در سلول‌های گیاهی نظیر فاگوسیتوز در سلول‌های جانوری می‌باشد که در مواجهه با پراکسید-هیدروژن صورت می‌گیرد. در سلول‌های گیاهی آنتی‌بادی بر علیه ترکیبات نوتروفیل NADPH اکسیداز افزایش می‌یابد که مسئول تولید سوپراکسید در طول فاگوسیتوز در سلول‌های گیاهی می‌باشد. در این آزمایش نیز فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در اثر القای تنش کاذب ناشی از استفاده از اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در اغلب تیمارها زیاد شد، که فرض می‌شود وظیفه‌ی NADPH اکسیداز حفاظت از غشای پلاسمایی در برابر تنش کاذب ایجاد شده باشد (۱۴۵، ۱۵۴، ۱۶۷ و ۱۸۴).



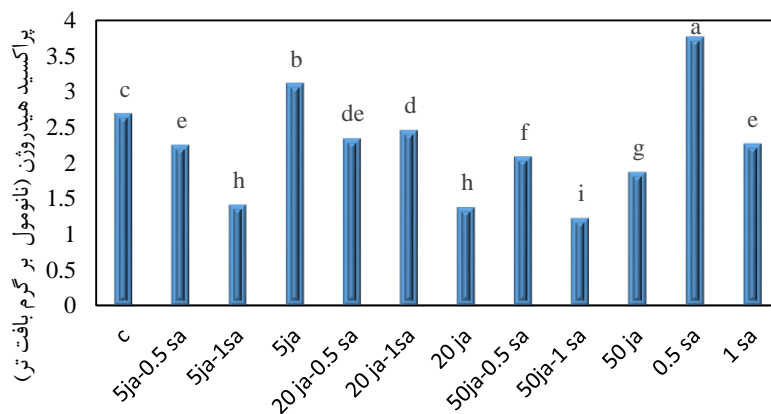
ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۱-۳-۴-۱ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت NADPH اکسیداز،

$$LSD = 0.0075$$

#### ۲-۱-۳-۴ پراکسید هیدروژن

در شکل ۲-۱-۳-۴ روند تغییرات غلظت پراکسید هیدروژن تحت اثر محلول پاشی ارائه شده است؛ محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در تیمار-های 5ja و 0.5 sa نسبت به شاهد شد. احتمالاً فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی سبب پالایش پراکسید هیدروژن گردید زیرا غلظت پراکسید هیدروژن فقط در دو تیمار بیشتر از شاهد بود.



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۲-۱-۳-۴-۲ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت پراکسید

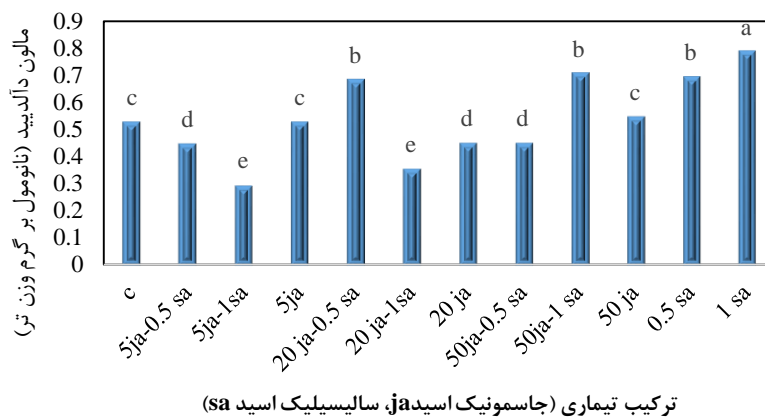
$$LSD = 0.063$$

#### ۳-۱-۳-۴ پراکسیداسیون لیپید

میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس مقدار مالون دی‌آلدید (MDA) موجود در هر عصاره تعیین گردید. میزان پراکسیداسیون لیپید فقط در چهار تیمار بیشتر از شاهد بود و بیشترین میزان مالون



دالدید در تیمار 1 sa با میانگین ۰/۷۸ نانومول بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۴-۳-۱-۳). گونه‌های فعال اکسیژن عوامل زیان‌بخشی هستند که باعث پراکسیداسیون تدریجی ساختارهای لیپیدی، غیرفعال-سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و صدمه‌ی اکسیداتیو می‌گردند (۶۴). اما در این محلول‌پاشی بر بیشتر تیمارها اثر منفی نداشت زیرا بدنبال القای تنش کاذب با محلول‌پاشی فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی زیاد شد و در نتیجه سبب پالایش گونه‌های فعال اکسیژن گردید.



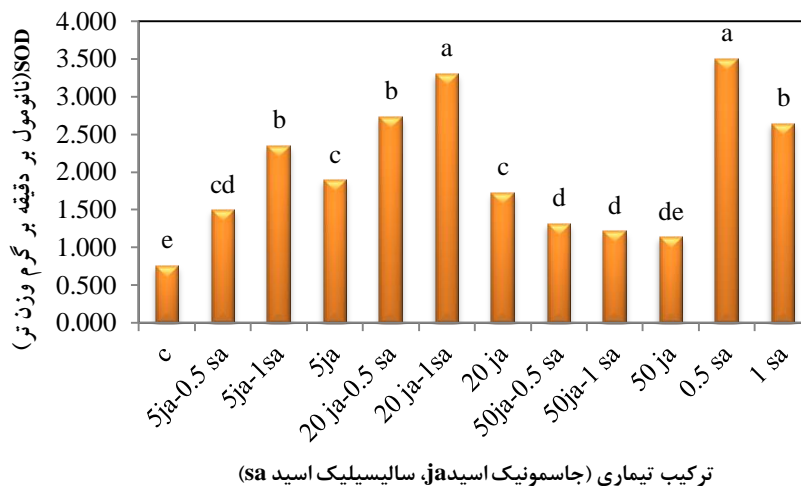
شکل ۴-۳-۱-۳- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر پراکسیداسیون لیپید،

$$LSD = 0.073$$

#### ۴-۱-۳-۴ فعالیت سوپراکسید دسموتاز

نتایج مربوط به بررسی اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در شکل ۴-۱-۳-۴ ارائه شده است. القای تنش کاذب با محلول‌پاشی سبب برانگیخته شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه شد. میزان SOD نیز که اولین جبهه‌ی مواجهه با رادیکال‌های آزاد می‌باشد در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در تیمارهای 0.5 sa و 20ja-1 sa با میانگین حدود ۳/۳ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. محلول‌پاشی سبب القای تنش کاذب در گیاه با افزایش فعالیت NADPH اکسیداز مسئول تولید رادیکال سوپراکسید در برخی تیمارها گردید. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه به جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن فعال شدند، SOD اولین و مهم‌ترین آنزیم در فرآیند سمیت‌زدایی ترکیبات ROS می‌باشند که با تبدیل رادیکال

سوپراکسید  $O_2^-$  به  $H_2O_2$  در سیتوسول، کلروپلاست و میتوکندری نقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال هیدروکسیل  $OH^-$  ایفا می‌کند، افزایش یافت (۷۱ و ۱۵۹).

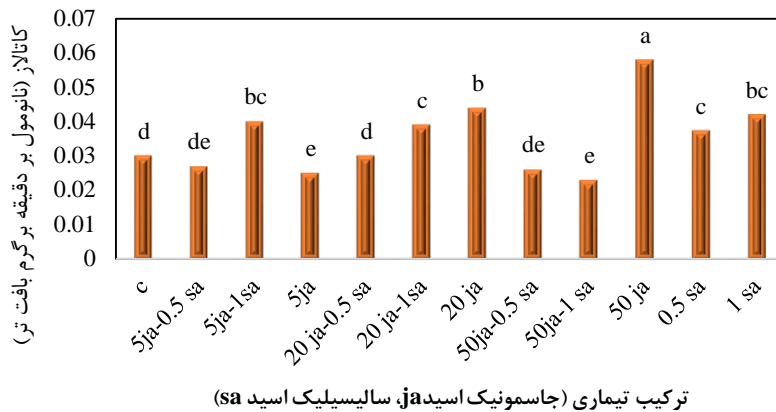


شکل ۴-۱-۳-۴ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت SOD در برگ، ۰/۴  
LSD=

#### ۴-۱-۳-۴ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز

در شکل ۴-۱-۳-۴ روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز ارائه شده است؛ محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک، فعالیت آنزیم کاتالاز را در ۶ تیمار نسبت به شاهد افزایش داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار 50 ja با میانگین ۰/۰۵۸ نانومول بر دقیقه بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد؛ از آنجا که هدف از محلول‌پاشی القای تنش کاذب با تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن در گیاه بود. سیستم‌های دفاعی گیاه در جهت پالایش رادیکال‌های ایجاد شده فعال شدند، سوپراکسید دسموتاز (شکل ۴-۱-۳-۴) و اسید آسکوربیک (شکل‌های ۴-۱-۳-۴ و ۲۰-۱-۳-۴-۱) (۲۱) موجب تبدیل رادیکال سوپراکسید به  $H_2O_2$  می‌گردند. کاتالاز از پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه‌ی سریع این ماده اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند. پراکسید هیدروژن برای سلول‌های گیاهی به خصوص کلروپلاست بسیار مضر می‌باشد. چرا که در غلظت‌های پایین باعث مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه‌ی کلونین به ویژه آنزیم‌های دارای گروه سولفیدریل از جمله

گلیسرآلدید، ۳-فسفات دهیدروژناز و فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات می‌شود. کاتالاز فقط در پراکسی‌زوم وجود دارد بنابراین دامنه‌ی فعالیت آن محدود است (۴۴ و ۱۲۷).



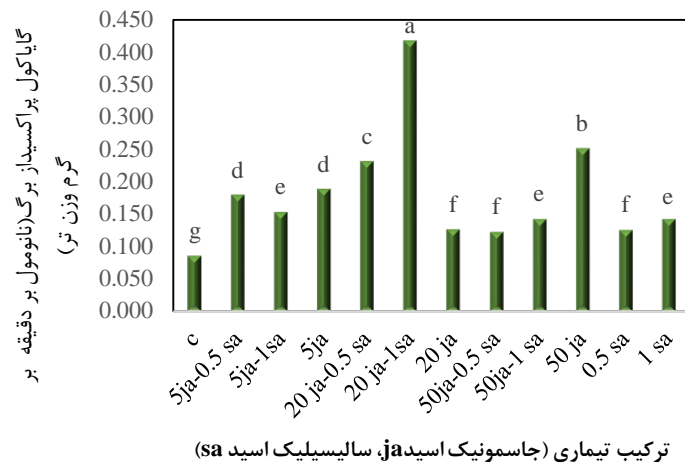
شکل ۴-۳-۱-۵- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت کاتالاز برگ،

$$LSD = 0.0048$$

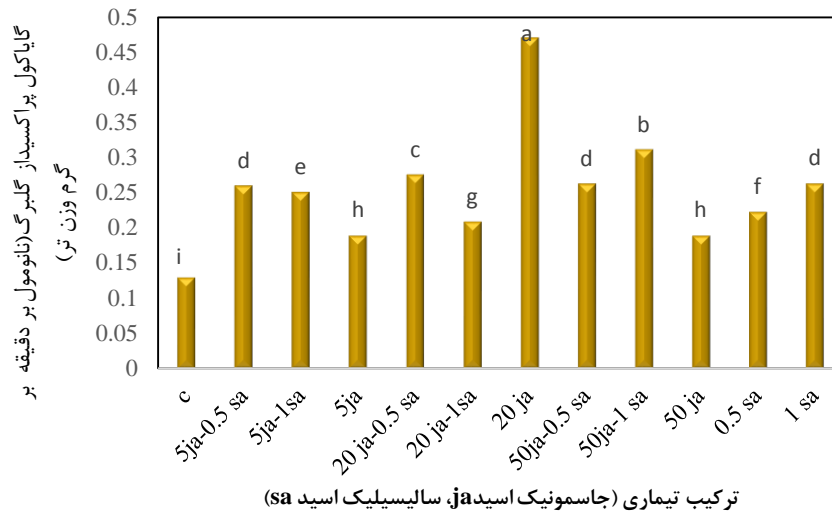
نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۳-۱-۲ پیوست نشان داد که محلول‌پاشی بر فعالیت GPX برگ و گلبرگ، POX برگ و گلبرگ، APX، G-S-T، GPX و GR در سطح احتمال ۹۹ درصد اثر معنی‌داری داشت.

#### ۴-۳-۱-۶- فعالیت گایاکول پراکسیداز

محلول‌پاشی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بافت برگ همه‌ی تیمارها (شکل ۴-۳-۱-۶) و همه‌ی تیمارهای گلبرگ (شکل ۴-۳-۱-۷) نسبت به شاهد شد. در برگ، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 20ja-1sa با میانگین ۰/۴۱ مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در گلبرگ در تیمار 20ja با میانگین ۰/۴۶ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر گلبرگ مشاهده شد. القای تنش کاذب با محلول‌پاشی موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسیدهای پروژن گردید، که به دنبال آن گایاکول پراکسیداز نیز بعنوان جزئی از سیستم‌های دفاعی گیاه جهت پالایش پراکسیدهای پروژن هم در برگ و هم در گلبرگ افزایش یافت، گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه‌ی آب اکسیژنه استفاده می‌کند، گایاکول به عنوان دهنده‌ی الکترون عمل می‌کند، گایاکول پراکسیداز در سیتوزول، دیواره‌ی سلولی و واکوئول نیز دیده می‌شود (۴۴، ۱۱۵ و ۱۶۶).



شکل ۴-۳-۱-۶- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز برگ،  $LSD = 0.012$ .

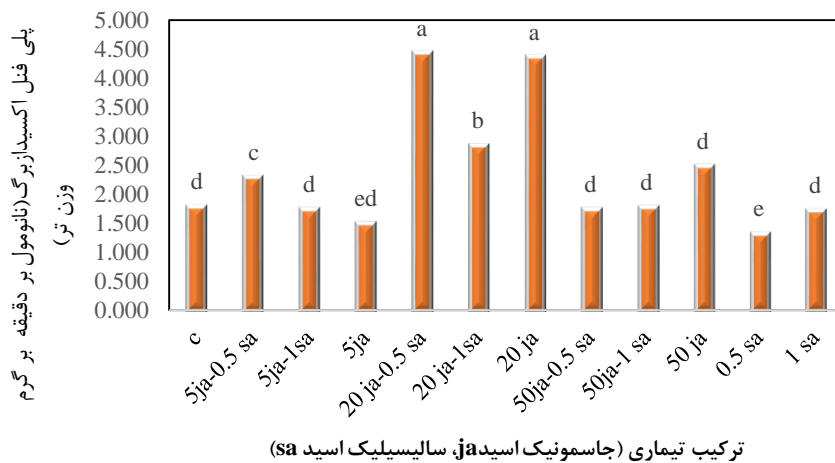


شکل ۴-۳-۱-۷- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز گلبرگ  $LSD = 0.0065$ .

#### ۴-۳-۱-۷- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

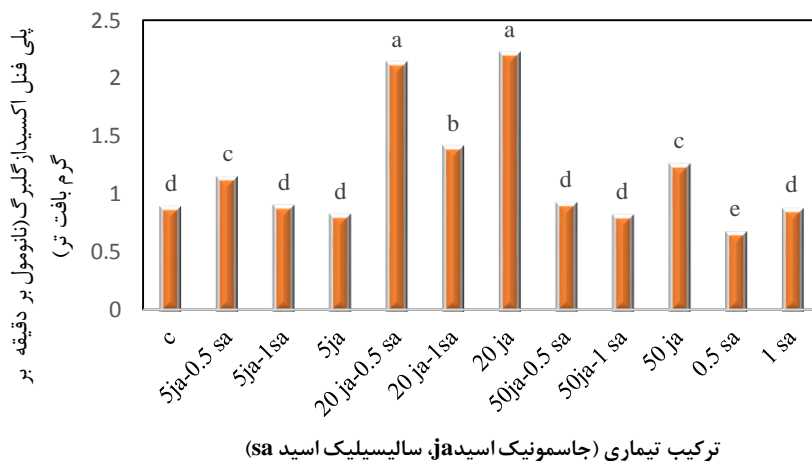
محلول پاشی با هدف القای تنش کاذب با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و سپس راه‌اندازی سیستم‌های دفاعی در گیاه صورت گرفت، در برخی از تیمارها (۵ تیمار)، محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در بافت برگ شد (شکل ۴-۳-۱-۸). بیشترین میزان فعالیت آنزیم در برگ در تیمارهای 20 ja و 20 ja- 0.5 sa با میانگین حدود ۴/۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر برگ مشاهده گردید. محلول پاشی در گلبرگ در ۵ تیمارها سبب افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد گردید (شکل

۴-۳-۱-۹). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بافت گلبرگ در تیمارهای و 20 ja-0.5 (۹-۱-۳-۴) با میانگین حدود ۲/۲ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر گلبرگ مشاهده شد. پلی فنل اکسیداز-ها در تمام بخش‌های گیاه یافت می‌شوند و از فنل‌ها به عنوان دهنده الکترون استفاده کرده و در بیوسنتز لیگنین نقش دارند (۱۱۵ و ۱۶۶). پراکسیدازهای محلول و آپوپلاستی می‌توانند با مشارکت فنل‌ها و اسید آسکوربیک، پراکسید هیدروژن را حذف کنند. پلی فنل اکسیداز یا تیروزیناز آنزیمی دارای دو اتم مس در هسته مرکزی خود می‌باشد و اکسیداسیون دی‌فنل‌ها به کینون‌ها را انجام می‌دهد. این آنزیم در این واکنش از اکسیژن مولکولی به عنوان سوپسترا استفاده می‌نماید (۴۴ و ۹۰).



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۸- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز برگ  $LSD= 0/318$

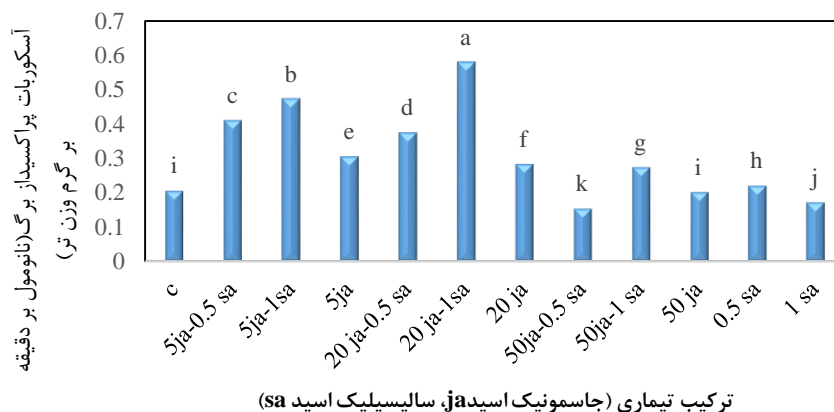


ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۹- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز گلبرگ  $LSD= 0/129$

#### ۴-۳-۱-۸ آسکوربات پراکسیداز

محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات-پراکسیداز در بیشتر تیمارها (۸ تیمار) نسبت به شاهد گردید (شکل ۴-۳-۱-۱۰). بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار 20 ja-1 sa با میانگین ۰/۵۸ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. آسکوربات پراکسیداز در سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست، سبب پالایش و زدودن  $H_2O_2$  می‌گردند پراکسیدازهایی که از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند به طور عمده در کلروپلاست، سیتوزول و پراکسی زوم تجمع داشته و وظیفه آنها حذف پراکسید هیدروژن تولید شده در این اندامک‌ها می‌باشد (۸۵). آسکوربات پراکسیداز با  $H_2O_2$  در حضور آسکوربات واکنش می‌دهد و منجر به تولید آب و مونو هیدروآسکوربات می‌شود. آسکوربات مجدداً توسط چرخه‌ی آسکوربات - گلوکاتایون بازسازی می‌گردد (۸۵ و ۱۷۱). آسکوربات دهنده‌ی الکترون بوده و سبب کاهش پراکسید هیدروژن به آب می‌شود. از آنجا که توازن بین گونه‌های فعال اکسیژن و پالاینده‌ها برای ادامه حیات ضروری می‌باشد گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، میزان بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را زیاد نموده و بدنبال آنها فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی افزایش پیدا می‌کند (۶۴).

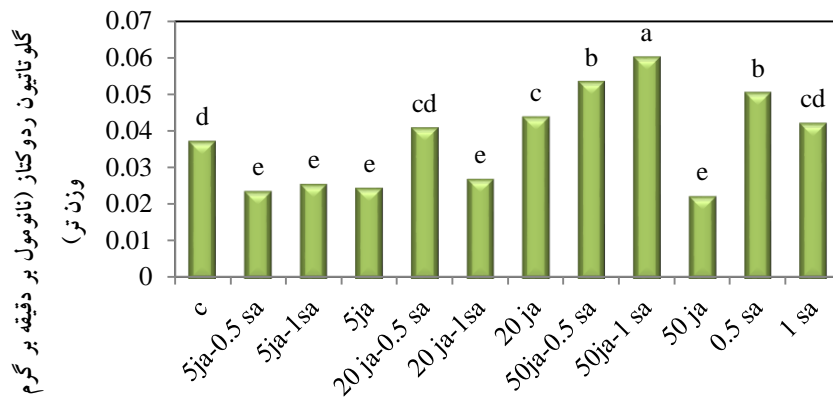


شکل ۴-۳-۱-۱۰- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت آسکوربات پراکسیداز برگ، LSD= ۰/۰۰۶.

### ۴-۳-۱-۹ فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون S- ترانسفراز

شکل ۴-۳-۱-۱۱ و ۴-۳-۱-۱۲ نتایج مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون S- ترانسفراز در بررسی محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را نشان می‌دهد. محلول‌پاشی سبب القای تنش اکسیداتیو گردید و فعالیت NADPH اکسیداز مسئول تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش یافت. برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه فعال شد. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گلوتاتیون ردوکتاز (۴ تیمار) و گلوتاتیون S- ترانسفراز در برخی تیمارها افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز در تیمار 50 ja-1 sa با میانگین ۰/۰۶ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده گردید. گلوتاتیون ردوکتاز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشد که حذف  $H_2O_2$  را از طریق چرخه‌ی مونودهیدروآسکوربات انجام می‌دهد. این آنزیم مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیا شده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به GSSG می‌باشد (۱۰۱). گلوتاتیون در چرخه‌های گزانتوفیل، مهلر و آسکوربات - گلوتاتیون نقش مؤثری را در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفا می‌کند. از این رو افزایش فعالیت GR به دلیل احیای مجدد گلوتاتیون اکسید شده بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۵۱ و ۱۵۹).

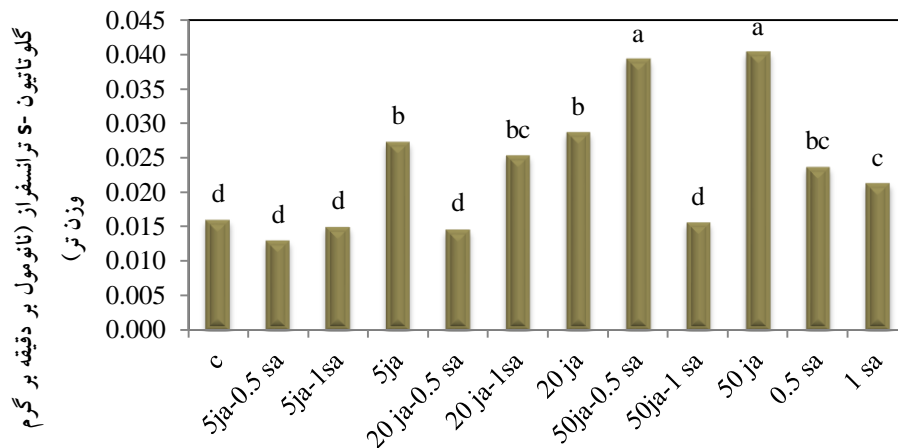
محلول‌پاشی بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز اثر معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد. محلول‌پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در ۷ تیمار نسبت به شاهد گردید؛ بیشترین فعالیت آنزیم در تیمارهای 50 ja و 50 ja-0.5 sa با میانگین ۰/۰۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بود. گلوتاتیون S- ترانسفراز در سیتوسول قرار دارد، نقش آنها کاتالیز ترکیب سوبستراهای الکتروفیلی با GSH می‌باشد، علاوه بر این آنزیم دارای نقش پراکسیدازی و ایزومرازی نیز می‌باشند. گلوتاتیون S- ترانسفراز در کنار نقش سم‌زدایی، انتقال ترکیبات زیستی را نیز بر عهده دارد (۱۵۶ و ۱۷۱).



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۱۱- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت گلوکوتاتیون ردوکتاز

LSD= ۰/۰۰۶ برگ



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۱۲- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت گلوکوتاتیون s-

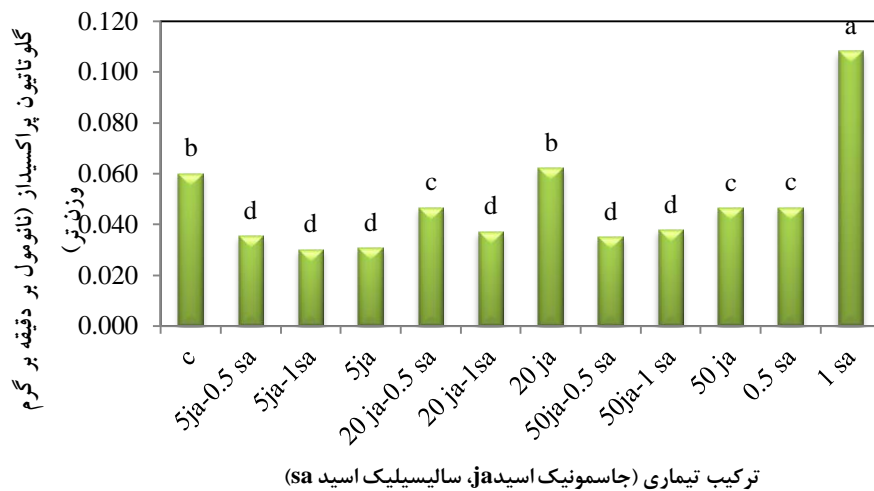
ترانسفراز در برگ، LSD= ۰/۰۰۵۳

#### ۴-۳-۱-۱۰- فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز

در شکل ۴-۳-۱-۱۳ فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز تحت اثر محلول پاشی ارائه شه است؛ محلول پاشی فعالیت آنزیم را فقط در تیمار 1 sa با میانگین ۰/۱۱ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر افزایش داد. گلوکوتاتیون پراکسیداز از نظر جایگاه در ستوزول و غشای داخلی میتوکندری قرار دارد. گلوکوتاتیون پراکسیداز، فسفولیپید هیدروپراکسید گلوکوتاتیون پراکسیداز (PHGPX) نیز نامیده می‌شود. گلوکوتاتیون پراکسیداز آنزیمی کلیدی در حفاظت از غشاهایی است که در معرض تنش اکسیداتیو قرار



گرفته‌اند. تولید این آنزیم طی تنش‌ها القا می‌شود. این آنزیم تولید دوباره‌ی اسیدهای چرب غیراشباع از فسفولیپید هیدروپراکسید را کاتالیز می‌کند (۱۸۴).



شکل ۴-۳-۱۳- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر گلوکاتایون

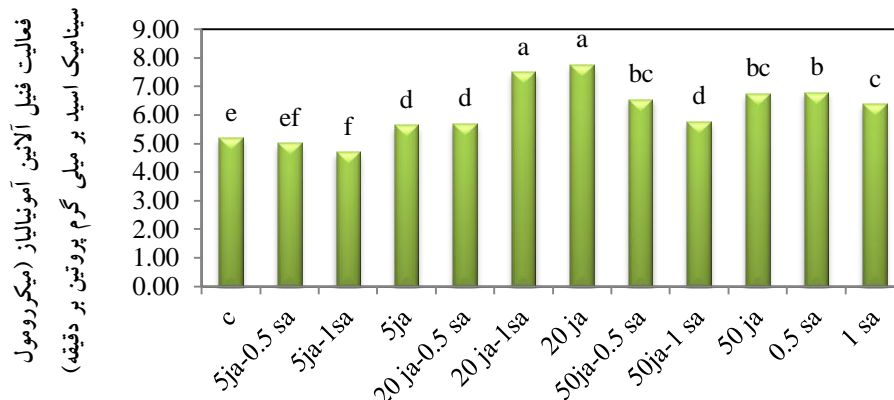
پراکسیداز در برگ،  $LSD = 0.008$

نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۳-۱-۳ پیوست نشان داد که محلول‌پاشی بر فعالیت PAL و غلظت فنل، فلانوول، فلاونوئید، آنتوسیانین گلبرگ، ASA گلبرگ و پروتئین محلول گلبرگ در سطح احتمال ۹۹ درصد اثرگذار بود.

#### ۴-۳-۱۱- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL)

نتایج مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم PAL در شکل ۴-۳-۱۴ ارائه شده است، محلول‌پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در ۹ تیمار نسبت به شاهد گردید؛ بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای 20 ja و 20 ja-1 sa با میانگین حدود ۷/۵۹ میکرومول سینامیک اسید بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه مشاهده شد. روند تغییرات ترکیبات فنلی با آنزیم PAL همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان داد. آنزیم PAL آغازگر مسیر فنیل پروپانوییدی می‌باشد که L- فنیل آلانین را با دامیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (۵۰ و ۹۰). افزایش فعالیت آنزیم PAL که اولین آنزیم مسیر بیوسنتزی فنل‌هاست در واکنش به الیسیتورها در بررسی‌های (۷، ۲۴، ۵۰ و ۹۰) گزارش

شده است. آنزیم PAL می‌تواند به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان نیز در نظر گرفته شود. زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده می‌باشد (۲۴).

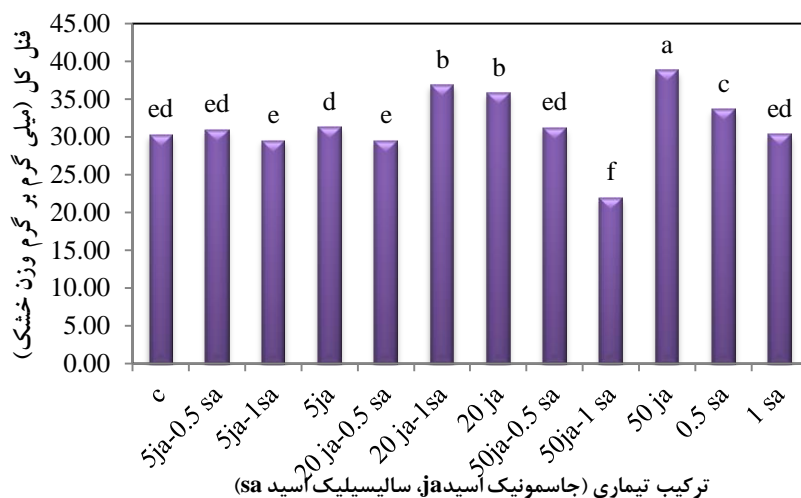


ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۱۴- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر فعالیت فنیل آلانین- آمونیا لایز در برگ، LSD= ۰/۴۱

#### ۴-۳-۱-۱۲- روند تغییرات فنل کل

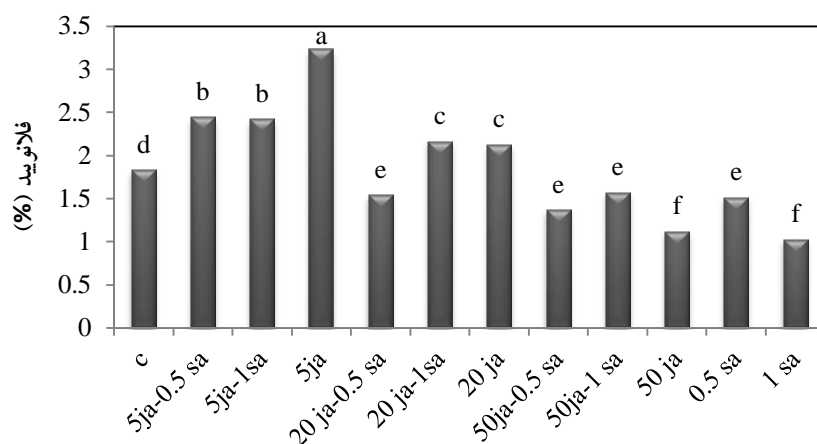
شکل ۴-۳-۱-۱۵- روند تغییرات ترکیبات فنلی را در اثر اعمال محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد، محلول‌پاشی سبب افزایش ترکیبات فنلی در ۴ تیمار نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان ترکیبات فنلی گلبرگ در تیمار 50ja با میانگین ۳۸/۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده گردید. ترکیبات فنلی به عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعدد مثل ربایش رادیکال‌های آزاد، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با انتقال سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپید ممانعت می‌کند (۲۰۸). افزایش فعالیت PAL و دیگر آنزیم‌های مسیر فنیل‌پروپانوییدی که به افزایش ترکیبات فنلی منجر می‌شود از نخستین پاسخ‌های گیاهان در شرایط تنش است (۴۳، ۴۸، ۵۱ و ۱۴۰).



شکل ۴-۳-۱-۱۵- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فنل کل در گلبرگ، ۱/۷۷  
LSD=

### ۴-۳-۱-۱۳ روند تغییرات فلاونوئید

شکل ۴-۳-۱-۱۶ مقایسه‌ی میانگین محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را بر میزان فلاونوئید گلبرگ سرخارگل را نشان می‌دهد. محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت فلاونوئید در ۵ تیمار نسبت به شاهد گردد. بیشترین غلظت فلاونوئید در تیمار 5 ja با میانگین ۳/۲۳ درصد وزن تر مشاهده شد. فلاونوئیدها به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی خود به طور مستقیم با وارد شدن به واکنش‌های احیایی و به طور غیرمستقیم به وسیله شلاته کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند و مانند بسیاری از پلی‌فنل‌های دیگر جمع‌کننده‌ی رادیکال‌های آزاد هستند، زیرا به عنوان گروه‌های قوی دهنده‌ی الکترون و پروتون‌دهنده عمل می‌کنند (۳، ۱۹۰ و ۲۰۱). خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها به اثر بازدارندگی آنها در تنفس میتوکندریایی بر می‌گردد (۱۸۹). ایزوفلاونوئیدها (ایزوفلاون‌ها) فعالیت ضد میکروبی دارند. ایزوفلاونوئیدها به خاطر نقش فیتوالکسینی‌شان به خوبی شناخته شده‌اند، فیتوالکسین‌ها ترکیبات ضد میکروبی هستند که در پاسخ به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی ایجاد می‌شوند، این ترکیبات گسترش عوامل بیماری‌زای مهاجم را محدود می‌کنند. از این رو دارای ارزش دارویی نیز می‌باشند (۱۰).



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

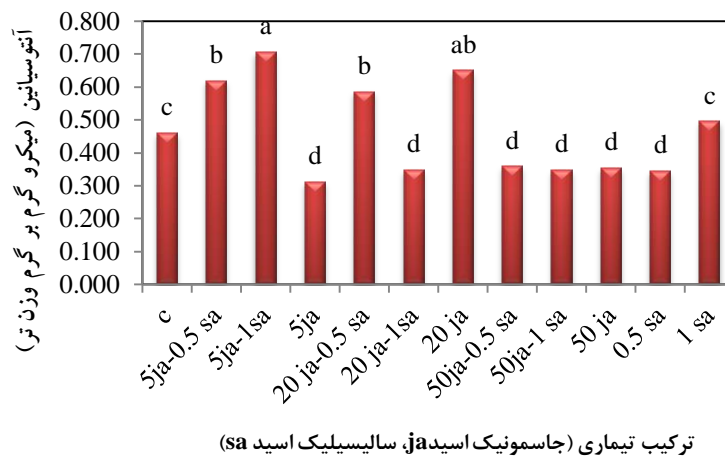
شکل ۴-۳-۱-۱۶- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت فلاونوئید در

سرخارگل، LSD= ۰/۲۴۸

#### ۴-۳-۱-۱۴ روند تغییرات آنتوسیانین در برگ و گلبرگ سرخارگل

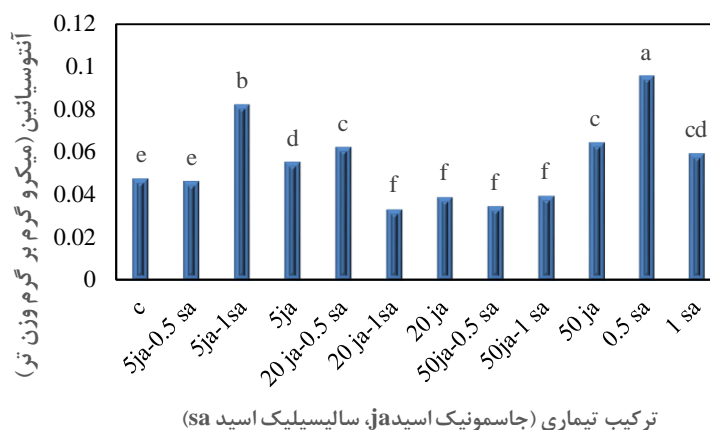
در شکل ۴-۳-۱-۱۷ روند تغییرات میزان آنتوسیانین گلبرگ در بررسی محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در سرخارگل ارائه شده است. محلول‌پاشی سبب افزایش میزان آنتوسیانین گلبرگ در ۴ تیمار شد. بیشترین میزان آنتوسیانین در گلبرگ سرخارگل در تیمار 5 ja-1 sa با میانگین ۰/۷ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. محلول‌پاشی سبب افزایش غلظت آنتوسیانین در ۶ تیمار نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان آنتوسیانین در برگ سرخارگل در تیمارهای 0.5 sa با میانگین ۰/۰۹۵ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۴-۳-۱-۱۸). آنتوسیانین‌ها (فلاونوئیدهای رنگی)، گلیکوزیدهایی هستند که در موقعیت کربن شماره‌ی ۳ خود و در برخی مواقع سایر موقعیت‌ها واجد قند هستند (۲۸). آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین گروه از رنگدانه‌های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که در حفاظت نوری نقش دارند. افزایش میزان آنتوسیانین در شرایط تنش در *Begonia Semperflorens* گزارش شده است. این افزایش به علت نقش حفاظت نوری آنتوسیانین به وسیله حذف مستقیم ROS در طول تنش اکسیداتیو می‌باشد (۲۲۱). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، تجمع آنتوسیانین نیز به-وسیله‌ی قندها القا می‌شود که ساکارز منجر به بیان ژن تولیدکننده رنگیزه‌های آنتوسیانین می‌شود. احتمالاً افزایش قندهای محلول به‌طور غیرمستقیم در بیان این ژن و تولید آنتوسیانین دخالت می‌کند.

در این مطالعه نیز در بیشتر تیمارها افزایش غلظت آنتوسیانین نسبت به شاهد مشاهده شد. آنتوسیانین‌ها در گیاه دارای نقش حمایتی هستند و به عنوان سد دفاعی در مقابل UV به شمار می‌روند (۱۴۴).



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۳-۴-۱۷- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان آنتوسیانین در گلبرگ، LSD= ۰/۰۶۶



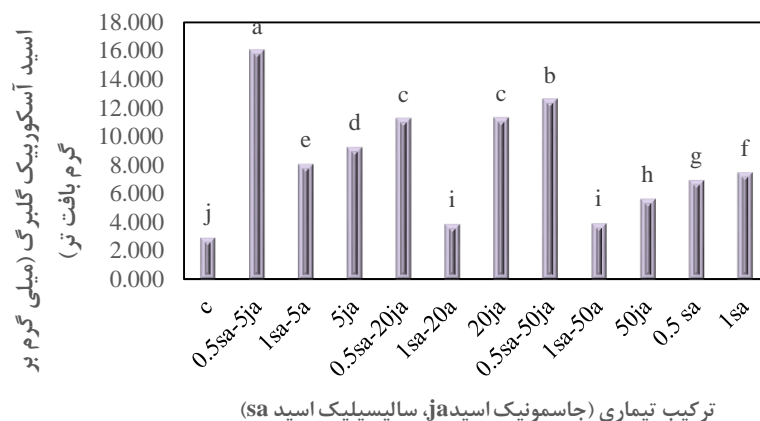
ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۳-۴-۱۸- مقایسه‌ی میانگین غلظت آنتوسیانین در برگ سرخارگل، LSD=۰/۰۰۶۴

### ۳-۴-۱۵- روند تغییرات اسید آسکوربیک

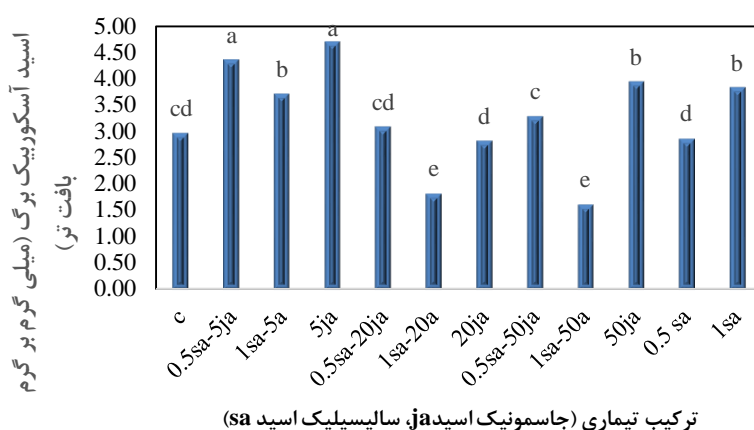
در شکل ۳-۴-۱۹ روند تغییرات میزان اسید آسکوربیک در گلبرگ سرخارگل ارائه شده است، محلول پاشی سبب افزایش غلظت اسید آسکوربیک در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان اسید آسکوربیک در گلبرگ سرخارگل در تیمار 5ja-0.5 sa با میانگین ۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد. محلول پاشی سبب افزایش غلظت اسید آسکوربیک در ۵ تیمار برگی نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان اسید آسکوربیک در برگ سرخارگل در تیمارهای 5ja-0.5 sa و 5ja با میانگین

حدود ۴/۵ میلی گرم بر گرم بافت تر مشاهده شد (شکل ۴-۳-۱-۲۰). با توجه به اینکه قندهای محلول پیش‌ماده‌ی اولیه‌ی بیوسنتز اسید آسکوربیک هستند، می‌توان گفت که افزایش قندها موجب افزایش میزان اسید آسکوربیک گردید. در این پژوهش تیمار با اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک نقش پیام‌رسانی داشته و به همین دلیل سبب افزایش تولید بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گردید. اسید آسکوربیک یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هاست که در طیف وسیعی از واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به عنوان پالاینده اصلی گونه‌های فعال اکسیژن واکنش‌دهنده عمل می‌کند. اسید آسکوربیک می‌تواند به طور مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن را با یا بدون آنزیم‌های کاتالیزوری شکسته و یا به صورت غیرمستقیم آن‌ها را به کمک توکوفرول به شکل احیا شده آن‌ها پاک‌سازی کند و حتی در واکنش با سوپراکسید نقش مشابهی با سوپراکسید دیسموتاز دارد. I- اسید آسکوربیک (ویتامین ث) ویتامینی مهم در رژیم غذایی انسان بوده و در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شود. به دلیل اهمیت تغذیه‌ای و دارویی آن، توزیع آن در گیاهان به طور گسترده‌ای اندازه‌گیری شده است (۳۲).



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۱۹- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت اسید آسکوربیک در گلبرگ، LSD= ۰/۴۷



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۲۰- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر غلظت اسید

آسکوربیک در برگ،  $LSD = 0.36$

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۳-۱-۴ پیوست) نشان داد که محلول پاشی بر پروتئین برگ، chl

a, b, کلروفیل کل، قند کل، قندهای احیایی و غیراحیایی و نشاسته در سطح احتمال ۹۹ درصد اثرگذار

بود.

#### ۴-۳-۱-۱۶ کلروفیل a

محلول پاشی سبب افزایش غلظت کلروفیل a در ۵ تیمار نسبت به شاهد شد (۴-۳-۱-۲۱). بیشترین

غلظت کلروفیل a در تیمار 50 ja-0.5sa با میانگین ۴/۴۴ میلی گرم بر گرم بافت تر مشاهده شد. ساختار

مولکول کلروفیل شامل حلقه‌ی پورفیرین، دم فیتولی و  $Mg^{2+}$  می‌باشد؛ دم فیتولی یک دی‌ترپن ۲۰

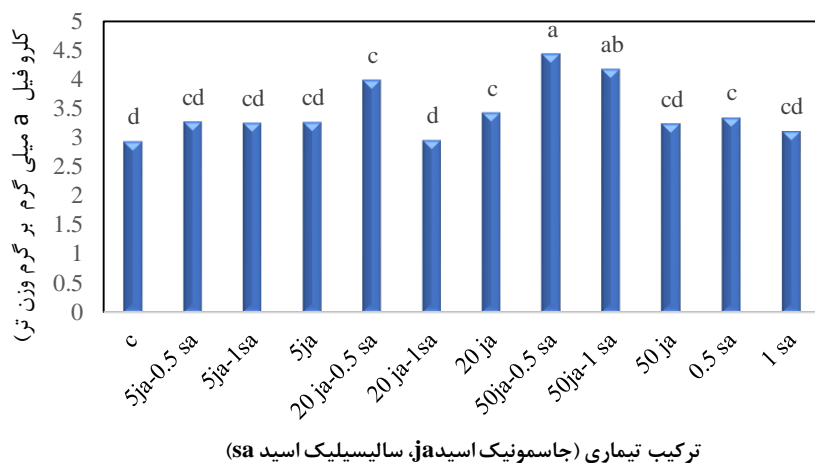
کربنه است که از مسیر کلروپلاستی سنتز می‌شود و جاسمونات‌ها نقش تحریک‌کننده در سنتز آنها

دارند. از جمله القای ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات سنتز می‌شود و جاسمونات‌ها نقش تحریک‌کننده در سنتز آنها

به افزایش سطح ترکیبات ترپنوییدی در گیاه می‌گردد (۴۱). در مطالعه‌ی دیگر در شاهدانه، کاربرد اسید

جاسمونیک سبب افزایش کلروفیل a (دم فیتولی ترپنی) و کارتنوئید (تتراترپن) گردید که هر دو ۴۰

کربنه بوده و از مسیر کلروپلاستی سنتز می‌شوند (۲۱).

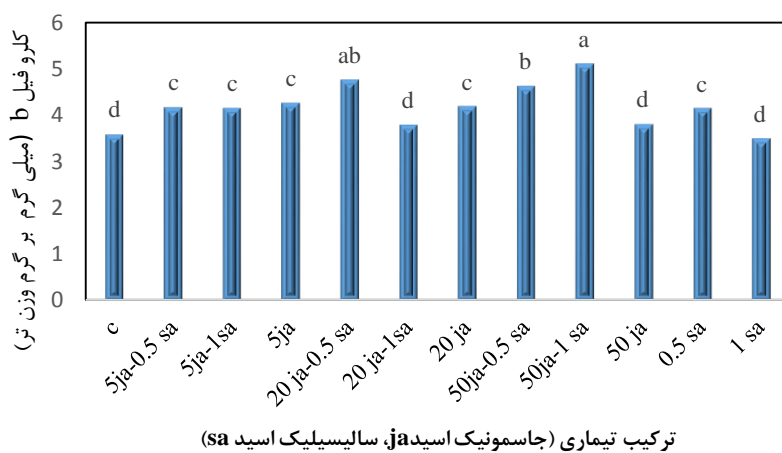


شکل ۴-۳-۱-۲۱ - مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت کلروفیل a، ۰/۳۴

LSD=

#### ۴-۳-۱-۱۷ کلروفیل b

محلول پاشی سبب افزایش غلظت کلروفیل b در بیشتر تیمارها (۸ تیمار) نسبت به شاهد گردید (شکل ۴-۳-۱-۲۲). بیشترین غلظت کلروفیل b در تیمار 50ja- 1 sa با میانگین ۵/۱ میلی‌گرم بر گرم بافت تر مشاهده شد. گزارشات حاکی از آن است که استفاده از متیل‌جاسمونات در حضور نور سبب تحریک تشکیل کلروفیل a و b می‌شود (۱۳۶)؛ به علاوه اینکه متیل‌جاسمونات در بیان برخی از ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل از طریق تشکیل آمینولولونیک اسید دخالت دارد (۲۰۸).



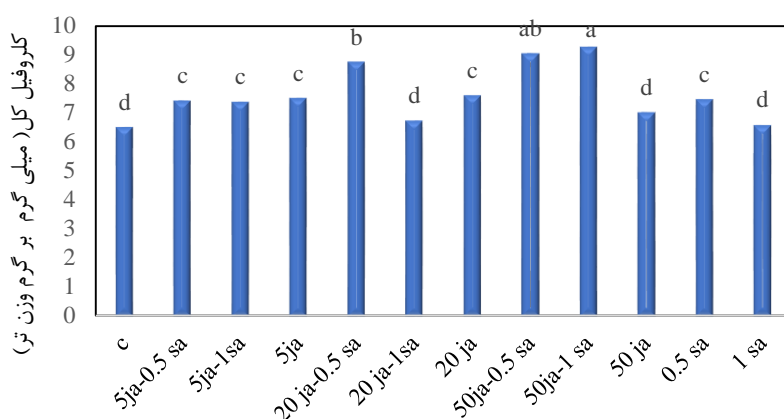
شکل ۴-۳-۱-۲۲ - مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت کلروفیل b، ۰/۳۳۵

LSD=



### ۴-۳-۱-۱۸ کلروفیل کل

محلول پاشی با جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید سبب افزایش غلظت کلروفیل کل در بیشتر تیمارها (۸ تیمار) نسبت به شاهد شد. بیشترین غلظت کلروفیل کل در تیمار 50ja-1sa با میانگین ۷/۶۱ میلی گرم بر گرم وزن تر و کمترین غلظت کلروفیل کل در تیمار شاهد با میانگین ۹/۳ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۴-۳-۱-۲۳). افزایش در میزان کلروفیل a و b سبب افزایش میزان کلروفیل کل گیاه گردید. میزان کلروفیل در گیاهان یکی از شاخص‌های مهم می‌باشد زیرا تعیین کننده ظرفیت فتوسنتزی گیاه می‌باشد. افزایش غلظت کلروفیل و نیز حفظ سلامت غشاهای کلروفیل در برابر رادیکال‌های آزاد حاکی از تداوم فتوسنتز، افزایش تولید ماده‌ی خشک و بدنبال آن افزایش میزان متابولیت‌های اولیه و ثانویه، رشد و عملکرد در گیاه را سبب می‌گردد.



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

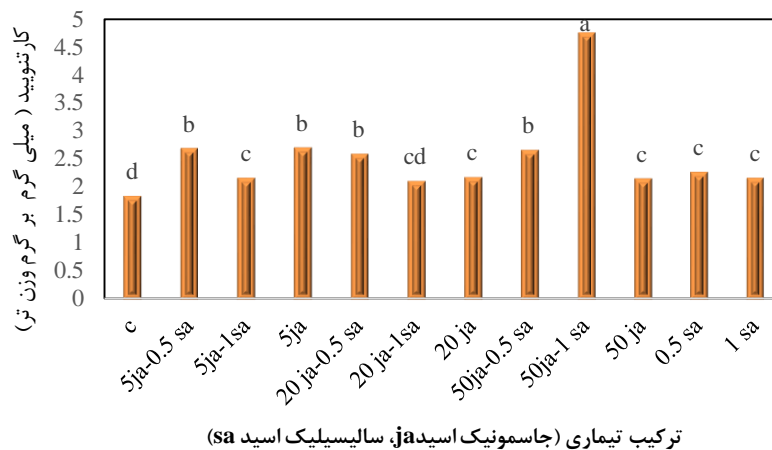
شکل ۴-۳-۱-۲۳ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر کلروفیل کل، ۰/۴۵۶

LSD=

### ۴-۳-۱-۱۹ کارتنوئید

در شکل ۴-۳-۱-۲۴ روند تغییرات میزان کارتنوئید ارائه شده است؛ محلول پاشی سبب افزایش غلظت کارتنوئید در ۱۰ تیمار نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان کارتنوئید در تیمار 50 ja-1 sa با میانگین ۹/۳ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد. کارتنوئیدها شامل  $\beta$  - کاروتن و گزانتوفیل‌ها، آنتی-اکسیدان‌های چربی دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در

مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کارتنویدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به صورت مستقیم اکسیژن منفرد را غیرفعال کند و یا از طریق فرو نشاندن کلروفیل برانگیخته شده، به صورت مستقیم از تشکیل اکسیژن منفرد جلوگیری کنند (۴۱ و ۴۸). در پژوهش حاضر نیز افزایش غلظت کارتنوید نسبت به شاهد نشان‌دهنده‌ی حفاظت بیشتر فتوسیستم در برابر صدمه‌ی اکسیداتیو و تنش‌های نوری می‌باشد (۳۲ و ۹۰).

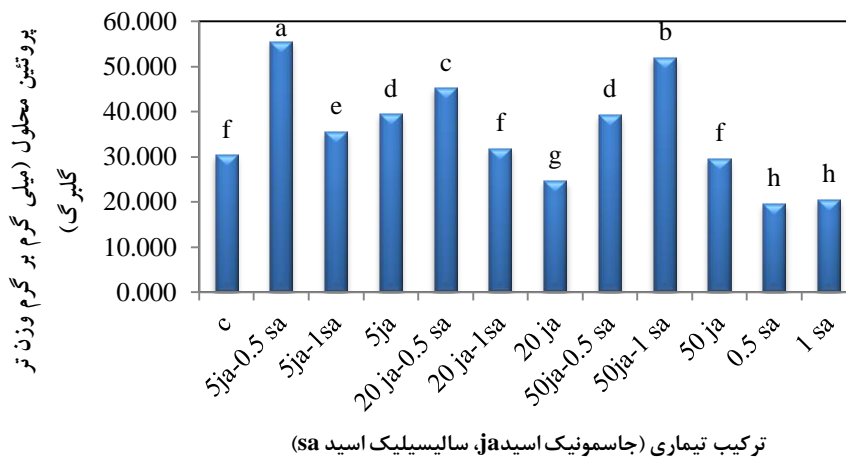


شکل ۴-۳-۱-۲۴ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت کارتنوید، ۲۷/۰  
LSD=

#### ۴-۳-۱-۲۰ روند تغییرات پروتئین محلول

مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات پروتئین محلول گلبرگ در شکل ۴-۳-۱-۲۵ ارائه شده است. محلول پاشی سبب افزایش پروتئین محلول در ۶ تیمار نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان پروتئین محلول در تیمارهای 5ja-0.5 sa با میانگین ۵۵/۵ و در تیمار شاهد ۳۰/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید. این افزایش تحت اثر تحریک‌کنندگی این دو ماده و بدنبال آن تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن می‌باشد که گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده، تولید پروتئین-های ضد تنش خود را افزایش داد و یا اینکه می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت‌های متابولیسمی یا ذخیره‌های در گیاه باشد. فرآیند پیری شامل پراکسیداسیون لیپید غشاهای داخلی کلروپلاست و تجزیه و پروتئین‌ها و غیره می‌باشد. همان‌طور که از نتایج این مطالعه مشهود است اعمال تیمار سبب بهبود شرایط گیاه در

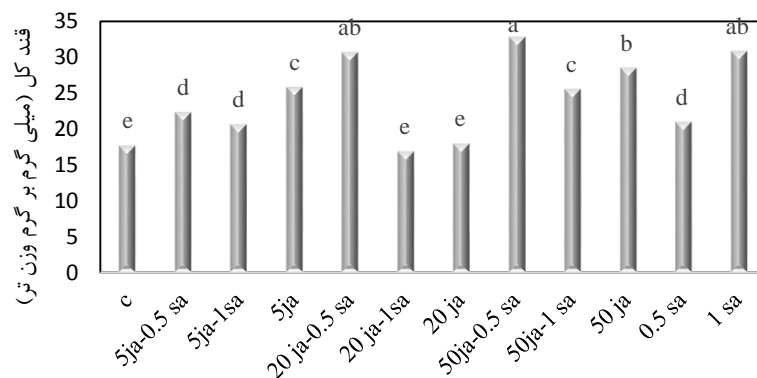
اغلب تیمارها نسبت به شاهد شد. این بهبود را می‌توان در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی دید که در نهایت سبب به تأخیر انداختن پیری، کاهش پروتئولیز و افزایش سنتز پروتئین‌های جدید دانست. گزارش شده است که اسید سالیسیلیک در تولید پروتئین‌های دفاعی و انواع متفاوتی از کینازها و روبیسکو تأثیرگذار است. احتمال می‌رود که اسید سالیسیلیک بتواند با تأثیر بر آنزیم‌های مسیر سنتزی در افزایش پروتئین‌ها دخالت داشته باشد (۱۷۶).



شکل ۴-۳-۱-۲۵- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان پروتئین محلول گلبرگ، LSD= ۳/۳۹

### ۴-۳-۱-۲۱ قند کل

شکل ۴-۳-۱-۲۶ روند تغییرات قند کل را تحت اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد. اعمال تیمار سبب افزایش قند محلول در بیشتر تیمارها (۹ تیمار) نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان غلظت قند محلول در تیمار 50ja-0.5 sa با میانگین ۳۲/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و در تیمار شاهد با میانگین ۱۷/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر حاصل گردید.

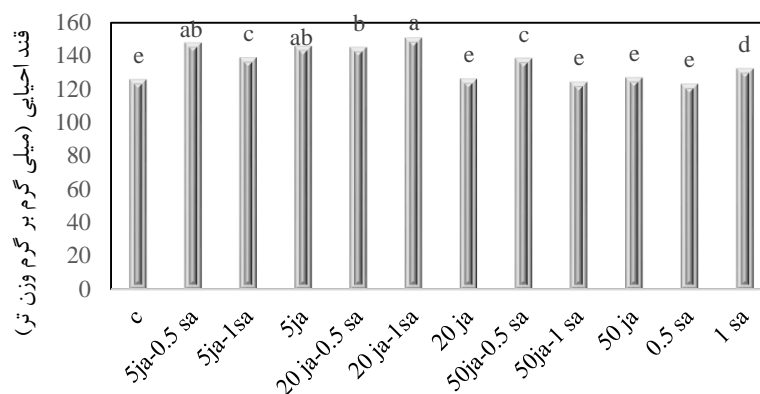


ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۲۶- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر قند کل،  $LSD= 2/52$

#### ۴-۳-۱-۲۲ قندهای احیایی

شکل ۴-۳-۱-۲۷ مقایسه‌ی میانگین قندهای احیایی تحت اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را نشان می‌دهد. میزان قندهای احیایی تحت اثر محلول پاشی در ۷ تیمار بیشتر از شاهد بود. همان‌طور که نتایج مقایسه‌ی میانگین قندهای احیایی نشان می‌دهد، بیشترین میزان غلظت قند-های احیایی در تیمارهای 20 ja-1sa با میانگین حدود ۱۵۰/۶۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به دست آمد. میزان قندهای احیایی در تیمار شاهد نیز برابر با ۱۲۵/۶۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود.



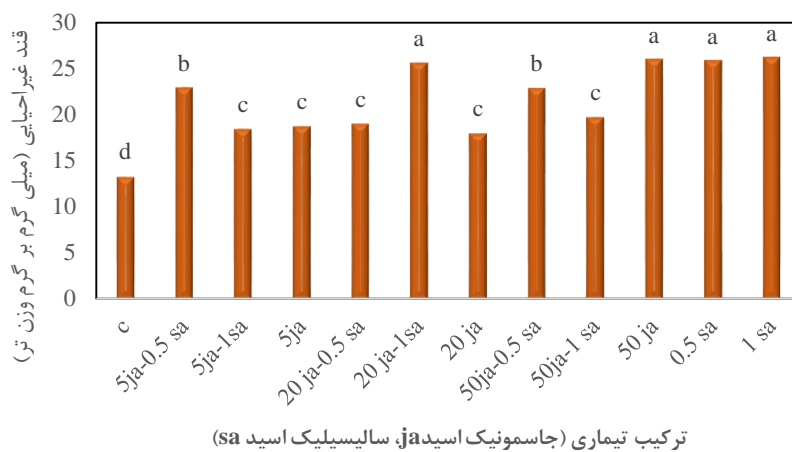
ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۲۷- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر قندهای احیایی،  $LSD= 5/03$

$LSD=$

### ۲۳-۱-۳-۴ قندهای غیراحیایی

در شکل ۲۸-۱-۳-۴ روند تغییرات قندهای غیراحیایی تحت اثر محلول پاشی ارائه شده است؛ محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان قندهای غیراحیایی اثر معنی داری در سطح یک درصد داشت. محلول پاشی سبب افزایش میزان قندهای غیراحیایی در همه تیمارها نسبت به شاهد شد؛ بیشترین میزان غلظت قندهای غیراحیایی در تیمارهای 50ja، 1sa-20ja و 0.5 sa و 1sa با میانگین ۲۵/۹ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید. کمترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با میانگین ۱۳/۳ میلی گرم بر گرم وزن تر حاصل گردید.

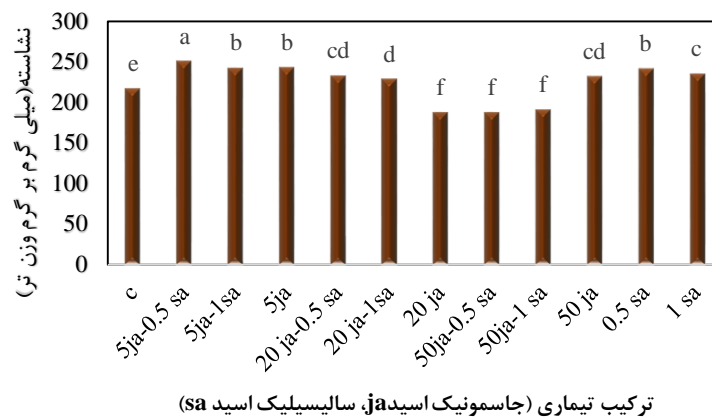


شکل ۲۸-۱-۳-۴- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر قندهای غیر احیایی،

$$LSD=2/17$$

### ۲۴-۱-۳-۴ نشاسته

روند تغییرات نشاسته تحت اثر محلول پاشی در شکل ۲۹-۱-۳-۴ ارائه شده است. محلول پاشی سبب افزایش میزان نشاسته در همه تیمارها در مقایسه با شاهد شد. بیشترین و کمترین غلظت نشاسته در تیمار 1 sa - 5 ja و شاهد به ترتیب برابر با ۲۵۰/۹ و ۲۱۷/۴۷ میلی گرم بر گرم بافت تر بود.



شکل ۴-۳-۱-۲۹- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر نشاسته، LSD= ۶/۱

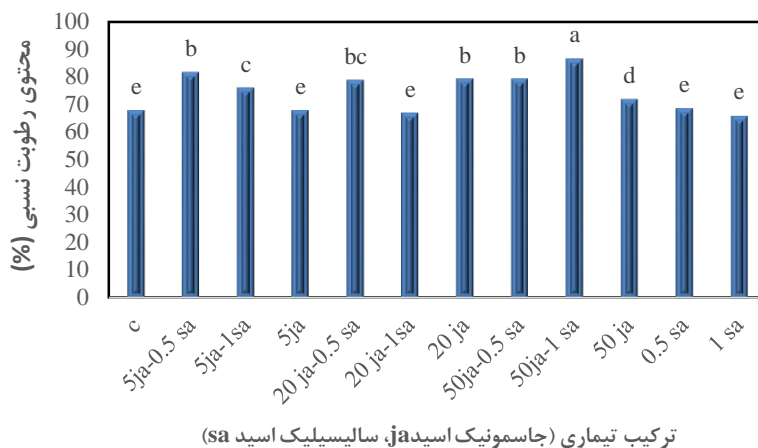
اسید جاسمونیک به عنوان ترکیبی پیام‌رسان شناخته می‌شود که نسخه‌برداری ژن‌های دخیل در متابولیسم دفاعی گیاه را تحریک می‌کند (۲۸ و ۱۷۸)، اسید سالیسیلیک نیز یکی از ساز و کارهای القای مقاومت می‌باشد اگر چه یک پیام‌رسان متحرک نیست اما سبب تجمع  $H_2O_2$  و در نتیجه القای تولید آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌گردند (۸۰). فعالیت این آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه سبب حفظ ساختارهای سلولی از جمله کلروفیل در برابر فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد. حفظ کلروفیل و سبزی‌نگی در گیاه سبب به تأخیر انداختن پراکسیداسیون لیپید و فرآیند زوال در گیاه می‌گردد. تداوم سبزی‌نگی به معنی تولید مواد فتوسنتزی بیشتر می‌باشد که نتایج مقایسه‌ی میانگین قندهای محلول، احیایی، غیر احیایی و نشاسته این افزایش را تأیید می‌کند (شکل‌های ۴-۳-۱-۲۷، ۴-۳-۱-۲۸، ۴-۳-۱-۲۹ و ۴-۳-۱-۳۰). همان‌طور که در مقایسه‌ی میانگین شکل‌های ۴-۳-۱-۲۸ و ۴-۳-۱-۲۹ مشاهده می‌شود غلظت قندهای غیراحیایی بیشتر از غیراحیایی می‌باشد، غلظت بیشتر قندهای غیراحیایی در برگ امری بدیهی می‌باشد که در زمان انتقال به قندهای غیراحیایی نظیر ساکارز تبدیل می‌شوند (۲۵).

جدول تجزیه واریانس ۴-۳-۱-۵ نشان داد که محلول‌پاشی بر محتوی رطوبت نسبی آب برگ و

هدایت روزه‌ای برگ با اطمینان ۹۹ درصد اثرگذار بوده است.

### ۲۵-۱-۳-۴ محتوی رطوبت نسبی آب برگ

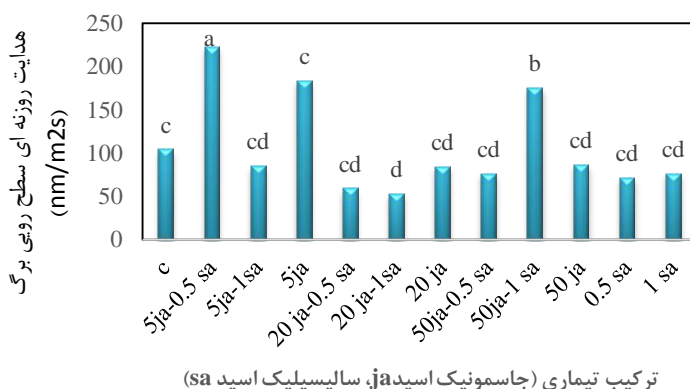
شکل ۳-۴-۱-۳۰ مقایسه‌ی میانگین محتوی رطوبت نسبی آب برگ را نشان می‌دهد، بیشترین میزان محتوی رطوبت نسبی آب برگ در تیمار 50j-1 sa با میانگین حدود ۸۳/۸٪ و کمترین میزان را تیمار 1sa با میانگین ۶۴/۵٪ مشاهده شد.



شکل ۳-۴-۱-۳۰- مقایسه‌ی میانگین محتوی رطوبت نسبی آب برگ  $LSD= ۳/۰۲$

### ۲۶-۱-۳-۴ هدایت روزنه‌ای سطح رویی برگ

شکل ۳-۴-۱-۳۱ روند تغییرات میزان هدایت روزنه‌ای سطح رویی برگ را نشان می‌دهد. بیشترین میزان هدایت روزنه‌ای در تیمار 5ja-0.5sa با میانگین ۲۲۲/۳ و کمترین میزان هدایت روزنه‌ای در تیمار 20ja-1sa با میانگین ۵۲/۷  $nm^2/s$  مشاهده گردید.



شکل ۳-۴-۱-۳۱- مقایسه‌ی میانگین هدایت روزنه‌ای سطح رویی برگ  $LSD= ۴۵/۷$

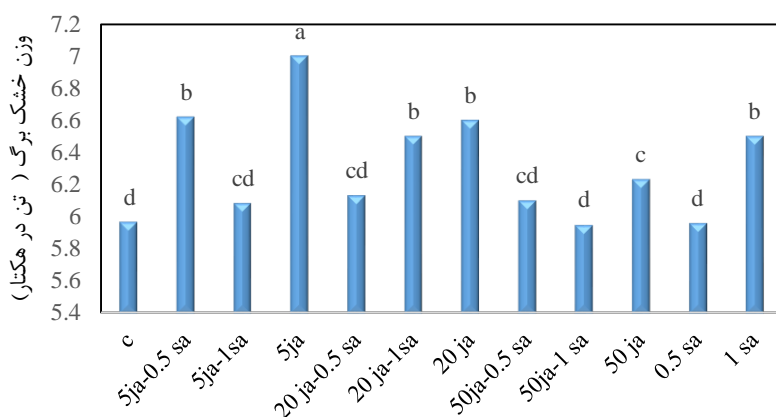
غلظت‌های 50ja-1 sa و 5ja-0.5sa موجب افزایش ۱/۲ برابری محتوی رطوبت نسبی برگ نسبت به شاهد گردید. محتوای رطوبت مناسب سبب تورژسانس سلول‌های روزنه و باز بودن روزنه‌ها و در نتیجه افزایش هدایت روزنه‌ای گردید. هدایت روزنه‌ای بالاتر برای تبادلات گازی مطلوب و به ویژه ورود CO<sub>2</sub> و فتوسنتز بیشتر و رسیدن به عملکرد بالاتر ضروری می‌باشد. گزارش شده است که اغلب میزان بالایی از تنظیم هماهنگ بین هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز دیده می‌شود (۱۳۴ و ۸۶). رابطه‌ی مثبت بین فتوسنتز و هدایت روزنه‌ای توسط (۱۳۴) گزارش شده است، با افزایش هدایت روزنه‌ای میزان CO<sub>2</sub> ورودی برای استفاده در فتوسنتز بیشتر می‌شود که در نتیجه‌ی ورود ماده‌ی خام اولیه‌ی مورد نیاز برای فتوسنتز، میزان این فرآیند نیز افزایش می‌یابد (۱۳۴).

جدول ۴-۳-۱-۶ پیوست تجزیه واریانس صفات ارتفاع، تعداد شاخه‌فرعی، وزن خشک برگ، ریشه، ساقه، گل، تعداد غنچه و گل را تحت اثر محلول‌پاشی نشان می‌دهد نتایج نشان داد که محلول‌پاشی بر کلیه صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

#### ۴-۳-۱-۲۷ وزن خشک برگ

شکل ۴-۳-۱-۳۲ روند تغییرات وزن خشک برگ تحت اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را نشان می‌دهد. بیشترین میزان وزن خشک برگ در تیمار 5ja با میانگین ۷ تن در هکتار و کمترین میزان وزن خشک برگ در تیمار شاهد با میانگین ۵/۹۶ تن در هکتار حاصل گردید. محلول-پاشی سبب افزایش وزن خشک شد که می‌توان به افزایش میزان کلروفیل (a و b) و قندها (شکل‌های ۴-۳-۱-۲۶، ۴-۳-۱-۲۷ و ۴-۳-۱-۲۸) نسبت داد. همچنین بین وزن خشک برگ با کلروفیل همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده گردید (جدول ۵ پیوست). نتایج حاصل از کاربرد اسید سالیسیلیک بر گیاه داوریی گشنیز نشان داد که ارتفاع بوته، تعداد شاخه‌فرعی در بوته، وزن خشک شاخه و برگ و عملکرد بذر به طور معنی‌داری تحت تأثیر اسید سالیسیلیک افزایش یافتند (۳۴).





ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۲۲- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر وزن خشک برگ، ۰/۲

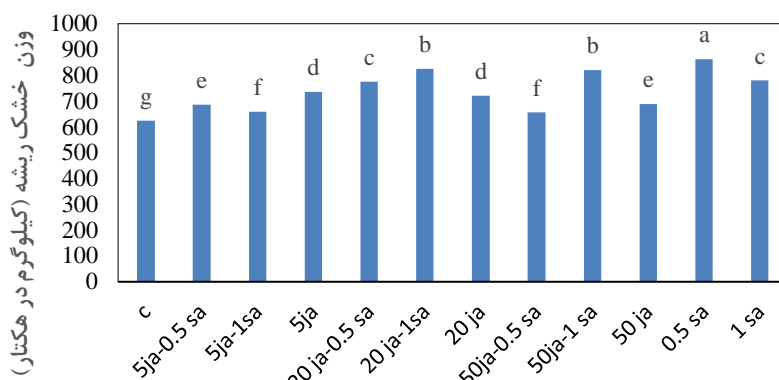
LSD=

۲۸-۱-۳-۴ وزن خشک ریشه

در شکل ۴-۳-۱-۳۳- مقایسه میانگین اثر محلول پاشی بر میزان وزن خشک ریشه سرخارگل ارائه

شده است، محلول پاشی وزن خشک ریشه را در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد؛ بیشترین

میزان وزن خشک ریشه در تیمار 0.5sa مشاهده شده است.



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۳۳- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر وزن خشک ریشه، ۲۵/۱

LSD=

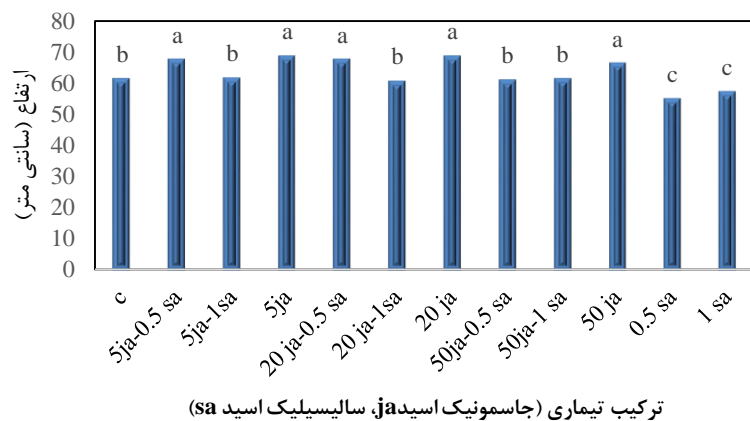
۲۹-۱-۳-۴ ارتفاع بوته

شکل ۴-۳-۱-۳۴- مقایسه‌ی میانگین اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر ارتفاع را

نشان می‌دهد. محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک سبب افزایش ارتفاع سرخارگل در

۵ تیمار نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان ارتفاع در تیمارهای 0.5 sa-5 ja، 0.5 sa-20 ja، 0.5 sa-20 ja، 20 ja، 5

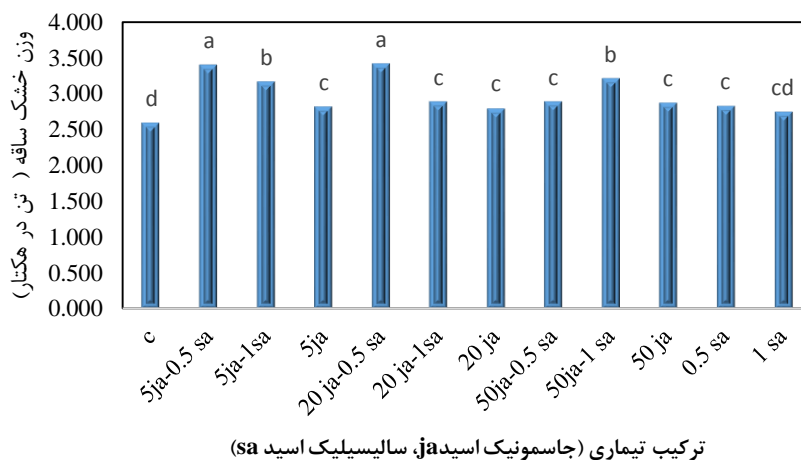
ja و ja 50 به ترتیب با میانگین حدود ۶۸/۶۶ سانتی متر حاصل گردید و در تیمار شاهد نیز ارتفاع بوته ۶۱/۳ سانتی متر بود. ارتفاع یکی از اجزای مهم در رسیدن به عملکرد بیشتر می باشد زیرا ارتفاع بیشتر می تواند سبب تولید برگ بیشتر، شاخه های فرعی بیشتر و بدنبال آن تعداد گل بیشتری را سبب گردند و از این طریق سبب افزایش عملکرد شوند.



شکل ۴-۳-۱-۳۴- مقایسه ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر ارتفاع،  $LSD= ۲/۹۲$

#### ۴-۳-۱-۳۰ وزن خشک ساقه

در شکل ۴-۳-۱-۳۵ روند تغییرات وزن خشک ساقه تحت اثر محلول پاشی ارائه شده است؛ بیشترین میزان وزن خشک ساقه در تیمارهای 5ja-0.5 sa و 20ja-0.5 sa با میانگین ۳/۳۸ تن در هکتار بدست آمد. میزان وزن خشک ساقه در تیمار شاهد با میانگین ۲/۵۸ تن در هکتار حاصل گردید.

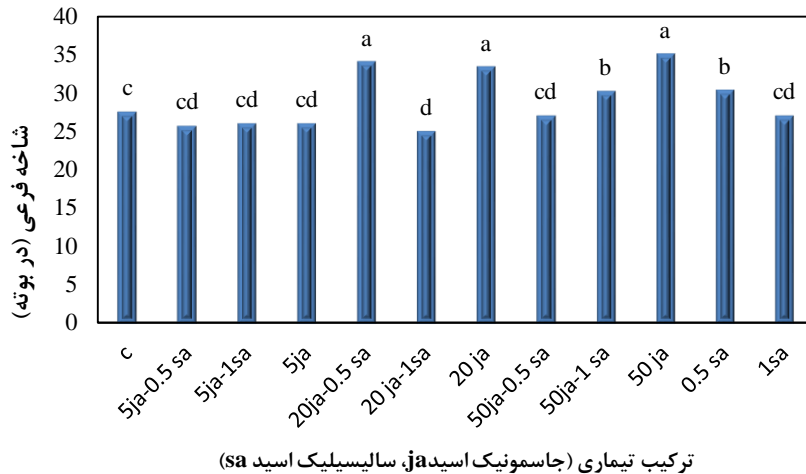


شکل ۴-۳-۱-۳۵- مقایسه ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر وزن خشک ساقه،  $LSD= ۰/۱۶$

$LSD=$

### ۳-۴-۱-۳۱ تعداد شاخه فرعی

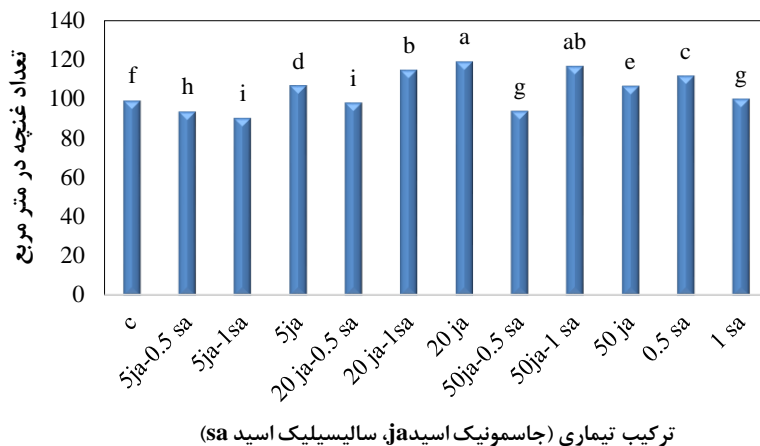
شکل ۳۶-۱-۳-۴ مقایسه‌ی میانگین اثر محلول‌پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر تعداد شاخه فرعی را نشان می‌دهد. بیشترین تعداد شاخه فرعی در تیمارهای 20 ja، 20 ja-0.5 sa و 50 ja با میانگین حدود ۳۵ شاخه فرعی در بوته حاصل گردید.



شکل ۳۶-۱-۳-۴ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر شاخه فرعی LSD= ۲/۵

### ۳-۴-۱-۳۲ تعداد غنچه

شکل ۳۷-۱-۳-۴ روند تغییرات تعداد غنچه تحت اثر محلول‌پاشی را نشان می‌دهد. محلول‌پاشی با جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید سبب افزایش تعداد غنچه در اغلب تیمارها نسبت به شاهد شد. بیشترین تعداد غنچه در تیمارهای 20ja با میانگین ۱۱۹/۳ عدد غنچه در واحد سطح حاصل گردید.

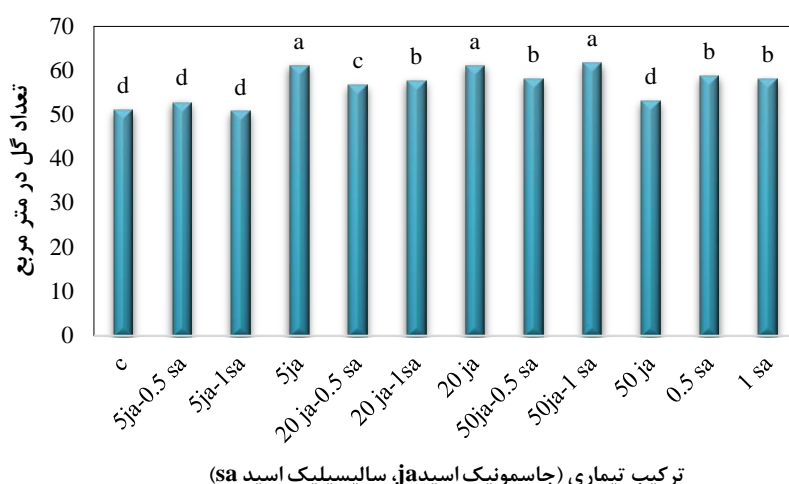


شکل ۳۷-۱-۳-۴ مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر تعداد غنچه، LSD= ۳/۰۶

اثر محلول پاشی بر زمان تا پنجاه درصد گلدهی: محلول پاشی در همه‌ی تیمارها سبب تسریع در رسیدن به پنجاه درصد گلدهی گردید، تیمار 5ja-0.5 sa و تیمار 50ja-0.5 sa در رده‌ی اول و دوم و تیمار شاهد در رده‌ی آخر قرار داشت (نتایج ارائه نشد).

#### ۴-۳-۱-۳۳ تعداد گل

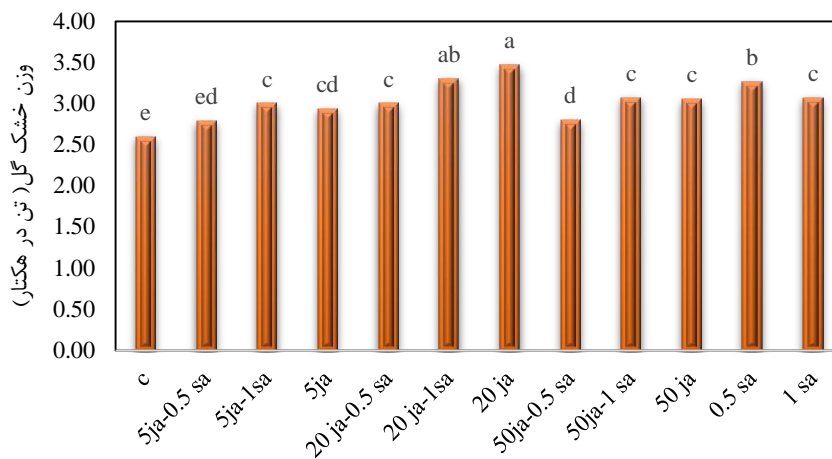
شکل ۴-۳-۱-۳۸ مقایسه‌ی میانگین اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر تعداد گل را نشان می‌دهد. محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک سبب افزایش تعداد گل در برخی تیمارها شد. بیشترین تعداد گل در تیمارهای 50ja - 1sa، 20ja و 5ja با میانگین ۶۱/۲ عدد در متر مربع عدد در متر مربع حاصل گردید. نتایج حاصل از کاربرد سالیسیلیک اسید بر گیاه گشنیز نشان داد که ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی در بوته، وزن خشک شاخه و برگ و عملکرد گیاه به طور معنی‌داری تحت تأثیر سالیسیلیک اسید افزایش یافتند (۳۴). دو صفت تعیین‌کننده‌ی میزان مشارکت ساقه در تأمین شیره پرورده برای گل و دانه می‌باشد، اول توانایی ساقه برای ذخیره‌ی مواد پرورده که بستگی به ارتفاع ساقه و وزن مخصوص آن دارد و دوم کارایی تبدیل و انتقال مجدد مواد ذخیره شده به گل و دانه می‌باشد (۲۵). همان‌طور که در مواد و روش ذکر شد محلول پاشی جاسمونیک و سالیسیلیک اسید از زمان آغاز فاز رویشی آغاز و در ۳ نوبت تکرار گردیده بود. فاز زایشی مرحله‌ی حساسی از رشد گیاه می‌باشد، چون گیاه باید اندام‌های جدید مثل غنچه، گل و بذر تولید کند، مواد غذایی خود را بین اندام‌های رویشی و زایشی تقسیم کند و هر چه گیاه در این شرایط کمتر تحت تنش قرار گیرد و شرایط رشدی مطلوب‌تر باشد برای رسیدن به تولید بالاتر مناسب‌تر می‌باشد. محلول پاشی با جاسمونیک و سالیسیلیک اسید سبب بوجود آمدن شرایط مطلوب‌تری در گیاه گردید. شرایط مطلوب و مناسب افزایش تعداد غنچه و گل در اکثر تیمارهای اعمال شده نسبت به شاهد شده بود که بدنبال افزایش تعداد گل و افزایش عملکرد را در پی داشت.



شکل ۴-۳-۱-۳۸- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر تعداد گل،  $LSD = 3/5$

#### ۴-۳-۱-۳۴ عملکرد (وزن خشک گل)

شکل ۴-۳-۱-۳۹ مقایسه‌ی میانگین اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را بر عملکرد وزن خشک سرخارگل نشان می‌دهد. محلول پاشی سبب افزایش وزن خشک گل در اغلب تیمارها شد. بیشترین میزان وزن خشک گل در تیمار 20 ja با میانگین ۳/۴۷ تن در هکتار مشاهده شد و در تیمار شاهد مقدار آن به ۲/۶ تن در هکتار رسید. محلول پاشی سبب بوجود آمدن شرایط مطلوب‌تری در گیاه گردید زیرا تنش کاذب القا شده سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز، گایاکول پراکسیداز برگ و گلبرگ، پلی‌فنل اکسیداز برگ و گلبرگ، آسکوربات پراکسیداز برگ شد همچنین محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله اسید آسکوربیک و فنل‌ها گردید همچنین سبب افزایش میزان کلروفیل a و b و نیز افزایش دوره‌ی سبزی‌نگی گیاه و به تعویق انداختن پیری برگ نسبت به شاهد گردید. شرایط مطلوب و مناسب سبب افزایش وزن خشک برگ، تعداد غنچه و گل شکل‌های (۴-۳-۱-۳۳، ۴-۳-۱-۳۷ و ۴-۳-۱-۳۸) در اکثر تیمارهای اعمال شده نسبت به شاهد شد که بدنبال افزایش وزن خشک برگ، تعداد غنچه و گل افزایش عملکرد وزن خشک گل را در پی داشت.



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۱-۳۹- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر وزن خشک گل، ۰/۱۹

LSD=

#### ۴-۳-۱ نتیجه‌گیری کلی

محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک موجی از انتقال پیام را در گیاه تحریک نمود، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی از جمله فنل کل، فلاونوئید، فلاونول و آنتوسیانین در اغلب تیمارها گردید. این ترکیبات که اغلب ترکیباتی فنیل‌پروپانوییدی می‌باشند به موازات افزایش آنزیم PAL افزایش یافتند این ترکیبات علاوه بر پالایش گونه‌های فعال اکسیژن دارای اهمیت دارویی می‌باشند، از این‌رو استفاده از اسید جاسمونیک و سالیسیلیک را برای افزایش ترکیبات فنیل‌پروپانوییدی می‌توان پیشنهاد نمود. یک سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی سبب پالایش مؤثر گونه‌های فعال اکسیژن و به تأخیر انداختن پیری در گیاه گردید، بدین شکل گیاه از ایجاد یک حالت محافظتی در برابر دامنه‌ی گسترده‌ای از عوامل تنش‌زا منتفع گردید. از جمله افزایش میزان کلروفیل‌ها و طول دوره‌ی سبزی‌نگی گیاه را سبب گردید که بدنبال آن افزایش وزن خشک برگ و گل (افزایش تولید) را در پی داشت. به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که محلول پاشی با اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در سطح مزرعه‌ای (افزایش عملکرد گیاه) و هم در خود گیاه توانست تولید و تجمع متابولیت ثانویه را تحریک کند که بسیار حائز اهمیت می‌باشد. چون می‌توان در مقیاس مزرعه و با هزینه‌ی کمتر و بدون نیاز به

امکانات خاص کشت بافت و غیره به تولید بالای متابولیت‌های ثانویه دست یافت. بیشترین میزان اسید آسکوربیک در تیمار پنج میکرومولار اسد جاسمونیک-نیم میلی مولار اسید سالیسیلیک مشاهده گردید که ۴/۶۸ برابر شاهد بود. بیشترین میزان فنل کل مهم‌ترین متابولیت ثانویه در سرخارگل نیز در تیمار نیم میلی مولار اسید سالیسیلیک مشاهده گردید. اسید سالیسیلیک ترکیبی ازران و به سهولت قابل دسترس است و پنج میکرومولار اسید جاسمونیک بسیار کم می‌باشد که سبب افزایش اسید آسکوربیک گردید که با توجه به اهمیت متابولیت ثانویه کاربرد آن توصیه می‌گردد.

#### ۲-۳-۴ پیشنهادات

با توجه به نتایج پژوهش حاضر پیشنهاد می‌شود

۱-میزان اینولین ماده‌ی مؤثر در ریشه گیاه سرخارگل در پژوهش‌های آتی سنجش گردد.

۲-مطالعه بر روی ژن‌ها و فعالیت دیگر آنزیم‌های دخالت‌کننده در مسیر بیوسنتزی فنیل-

پروپانوییدی تحت اثر این دو هورمون.

۳-مطالعه بر میزان سنتز متابولیت‌ها تحت اثر ایستورهای زیستی.

## ۴-۳-۲ نتایج و بحث آزمایشات مزرعه‌ای استویا

در این پژوهش اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر سنتز دو دسته‌ی جداگانه از متابولیت‌های ثانویه بررسی گردید، دسته‌ی اول اثر این دو الیسیتور غیرزیستی بر سنتز ترکیبات فنیل پروپانوییدی در گیاه استویا بررسی گردید. دسته‌ی دوم اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر سنتز گلیکوزیدهای استویول در استویا که ترکیباتی دی‌ترپن که متعلق به گروه ترپن‌ها، بزرگ‌ترین گروه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌باشند و مهمترین ماده‌ی موثره استویا می‌باشد بررسی گردید.

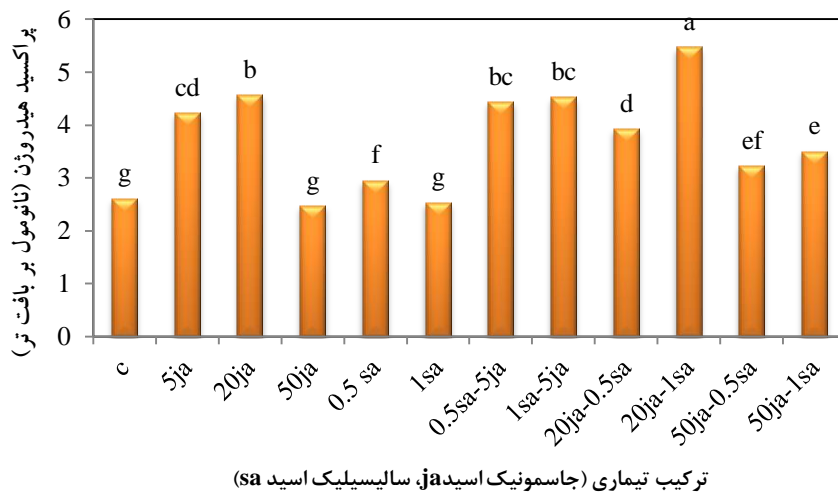
جدول ۴-۳-۱ پیوست تجزیه واریانس صفات  $H_2O_2$ ، EC، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی-فنل اکسیداز (POX)، گلوکاتیون S- ترانسفراز (G-S-T) و فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) را نشان می‌دهد نتایج نشان داد که محلول پاشی با احتمال یک درصد بر کلیه صفات اثرگذار بوده است.

## ۴-۳-۲-۱ پراکسید هیدروژن

وقتی مولکول‌های پیام‌رسان اسید جاسمونیک و سالیسیلیک به صورت خارجی بکار برده می‌شوند به صورت سیستمیک در گیاه حرکت کرده، موجب القای تنش کاذب در گیاه، بیان و فعالیت یک سری از ژن‌های دفاعی می‌گردند (۷۸ و ۸۰). القای تنش کاذب از طریق اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن و هدایت الکتریکی انجام شد. محلول پاشی سبب افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در ۹ تیمار نسبت به شاهد شد (شکل ۴-۳-۱)؛ بیشترین میزان غلظت پراکسید هیدروژن در تیمار جاسمونیک 20ja-1sa مشاهده گردید که غلظت آن ۵/۴۶ نانومول در بافت تر بود. در شرایط تنش اکسیداتیو موازنه بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی مختل می‌گردد و در نتیجه میزان رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن در صورت عدم پالایش سبب پراکسیداسیون لیپید، تضعیف غشاهای سلولی و سایر اندامک‌ها می‌گردند. اکسیژن فعال بیش از ظرفیت گیاه تولید شده، باعث خسارت به گیاه، کاهش رشد و عملکرد می‌گردد (۱۵ و ۱۶). اسید سالیسیلیک و جاسمونیک به عنوان یک مولکول



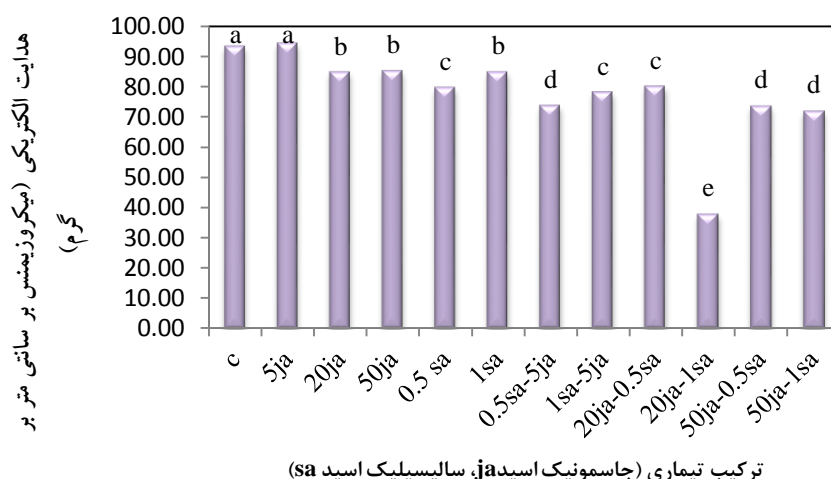
پیام رسان داخلی با مسیر پیام‌رسانی رادیکال‌های آزاد بر همکنش دارند (۱۸۰). اگر چه مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد مخرب می‌باشند، با وجود این مقادیر کم گونه‌های فعال اکسیژن، بویژه پراکسید هیدروژن نقش پیام‌رسانی داشته و مسیر دفاعی خاص، مانند سنتز برخی هورمون‌ها و فعالیت آنتی-اکسیدان‌های خاص را فعال می‌کنند (۷).



شکل ۴-۳-۲-۱- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان پراکسید هیدروژن،  
LSD= ۰/۳۲

### ۴-۳-۲-۲ هدایت الکتریکی

هدایت الکتریکی شاخصی از پایداری غشاها می‌باشد؛ روند تغییرات آن تحت اثر محلول پاشی در شکل ۴-۳-۲-۲ نشان داده شده است. همان‌طور که نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان می‌دهد بیشتر تیمارهای محلول پاشی (۱۰ تیمار) میزان هدایت الکتریکی کمتری نسبت به شاهد داشته‌اند یا به عبارت دیگر از پایداری غشای بیشتری نسبت به شاهد برخوردار بودند. افزایش میزان پراکسید هیدروژن در اغلب تیمارها نسبت به شاهد سبب افزایش میزان هدایت الکتریکی نگردید که می‌توان به سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پالاینده گونه‌های فعال اکسیژن نسبت داد (شکل‌های ۳-۴-۲-۳، ۳-۴-۲-۳ و ۳-۴-۲-۴ و ۳-۴-۲-۵) که مانع از تولید و انباشتگی رادیکال‌های آزاد و خسارت به اسیدهای چرب غیراشباع غشاهای سلولی گردید. در نهایت این تغییرات مانع از اختلال در عملکرد غشاء، کاهش ویسکوزیته، نفوذپذیری و نشت مواد از غشاء سلول گردید.

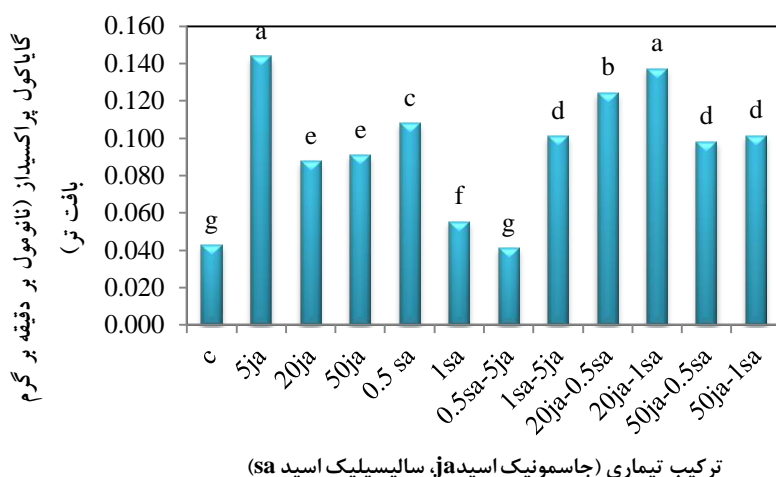


شکل ۴-۳-۲-۲- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان هدایت الکتریکی،

$$LSD = 4/3$$

#### ۴-۳-۲-۳- روند تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

نتایج جدول تجزیه واریانس ۱-۲-۴-۳ پیوست نشان می‌دهد محلول پاشی با اطمینان ۹۹ درصد بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز اثرگذار بوده است. گیاه در جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های خود را افزایش داد، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) بالاتر از شاهد بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای 5ja و 20ja-1sa با میانگین ۰/۱۴۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد. گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی نظیر گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن استفاده می‌کند، گایاکول به عنوان دهنده‌ی الکترون عمل می‌کند، این آنزیم در سیتوزول، دیواره سولی و واکوئول دیده می‌شود. گزارش شده است که متیل جاسمونات باعث افزایش فعالیت آنزیم در گیاه آرابیدوپسیس گردیده است (۳۳). تیمار با متیل جاسمونات ۲۰۰ میکرومولار در گیاه جنسینگ فعالیت این آنزیم را در روز سوم، پنجم و هفتم افزایش داد و در روز نهم به اوج فعالیت رسید (۱۹).



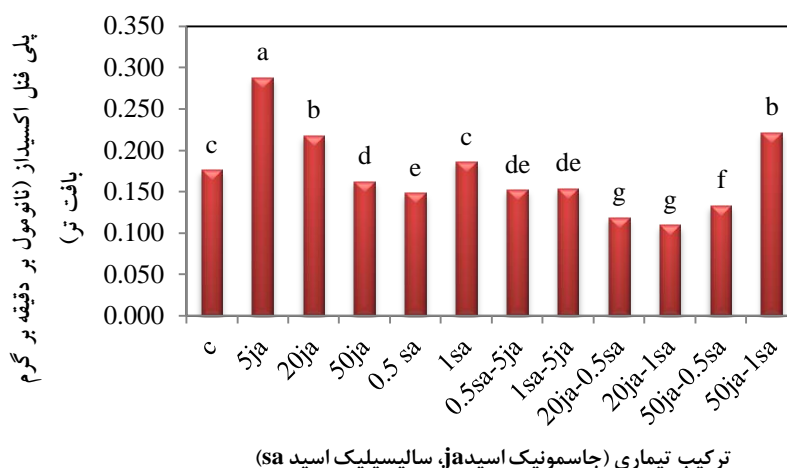
ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۲-۳-۴- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر آنزیم گایاکول پراکسیداز،

$$LSD = 0.006$$

#### ۴-۲-۳-۴- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

شکل ۴-۲-۳-۴- نتایج مقایسه میانگین تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز را نشان می‌دهد؛ میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای 5ja، 20ja و 50ja-1sa بیشتر از شاهد بود؛ بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار 5ja با میانگین 0.129 و در تیمار شاهد نیز 0.1176 نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بدست آمد. افزایش میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز با افزایش میزان فنل کل (شکل ۴-۳-۲-۷) همراه بود. که می‌تواند حاکی از این امر باشد که آنزیم منبع کافی از فنل‌ها را جهت پالایش رادیکال‌های آزاد تحت تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اختیار داشت. فنل‌ها از ترکیبات دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۹۰) و از طریق دادن الکترون یا هیدروژن، سلول‌ها را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند و به بیان دیگر به دلیل دارا بودن ویژگی ردوکس (۱۱۲) مقادیر بهینه آن می‌تواند حاکی از وضعیت مطلوب تر ردوکس سلولی باشد. افزایش فعالیت این آنزیم در قارچ خوراکی با غلظت 0.5 میلی‌مولار متیل جاسمونات گزارش شده است (۲۸). تیمار با اسید جاسمونیک در گیاه توتون نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز گردیده است (۲۸).

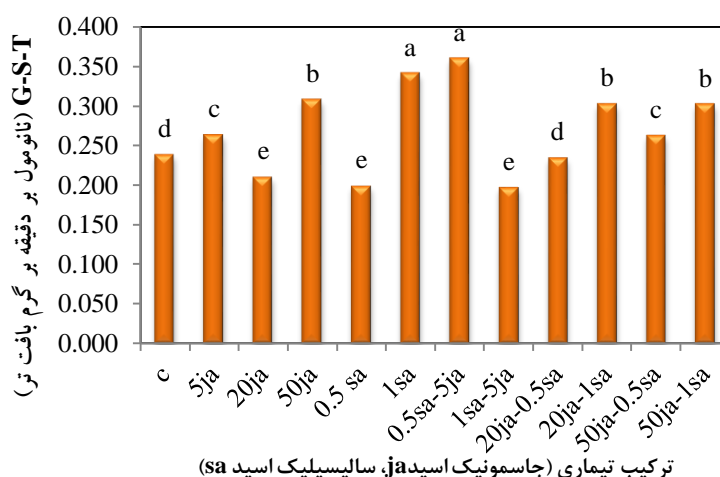


شکل ۴-۳-۲-۴- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر آنزیم پلی فنل اکسیداز

LSD= ۰/۰۱۲

#### ۴-۳-۲-۵- فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز

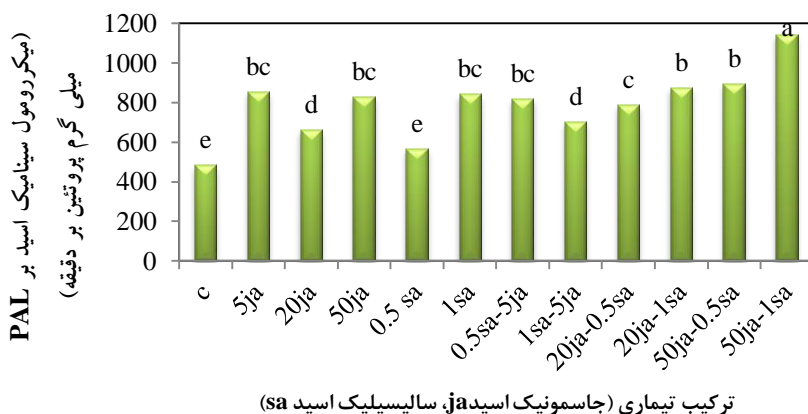
شکل ۴-۳-۲-۵- مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم گلوکاتایون S- ترانسفراز را تحت اثر محلول پاشی نشان می‌دهد. محلول پاشی فعالیت آنزیم را در ۷ تیمار بیشتر از شاهد نمود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای 1sa و 5ja-0.5sa با میانگین ۰/۳۵ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بود و فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد ۰/۲۴ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بود. گلوکاتایون S- ترانسفراز در سیتوسول قرار دارد، نقش آنها کاتالیز ترکیب سوبستراهای الکتروفیلی با GSH می‌باشد، علاوه بر این آنزیم دارای نقش پراکسیدازی و ایزومرازی نیز می‌باشند. گلوکاتایون S- ترانسفراز در کنار نقش سم‌زدایی، انتقال ترکیبات زیستی را نیز بر عهده دارد (۱۵۶ و ۱۶۹). گلوکاتایون S- ترانسفراز گیاهی نقش مهمی را در سنتز متابولیت‌های ثانویه نظیر آنتوسیانین و سینامیک اسید ایفا می‌کند. رنگدانه‌های آنتوسیانین در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند و در نهایت در واکوئل جای می‌گیرد. فعالیت B Z-2 سبب انتقال Cyanidin-3-glucoside به واکوئل می‌گردند، جایی که آنتوسیانین به رنگ قرمز یا بنفش دیده می‌شود. B Z-2 (Bronze 2) نوعی از GST می‌باشد که سبب تشکیل ترکیبات GSH-آنتوسیانین می‌گردند که به این فرم اجازه‌ی انتقال به واکوئل با پمپ گلوکاتایون را می‌گیرد، افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند افزایش برخی متابولیت ثانویه را افزایش دهد (۱۵۶ و ۱۶۹).



شکل ۴-۲-۳-۵- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر آنزیم G-S-T، LSD= ۰/۰۱۳

#### ۴-۲-۳-۶- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز

شکل ۴-۲-۳-۶ مقایسه‌ی میانگین روند تغییرات فعالیت آنزیم PAL را تحت اثر محلول پاشی نشان می‌دهد. محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم در بیشتر تیمارها (۱۰ تیمار) نسبت به شاهد گردید، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ترکیبی 50ja-1sa با میانگین ۱۱۴۰ میکرومول سینامیک اسید بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه حاصل گردید. فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم GST داشت؛ فعالیت آنزیم PAL حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است. آنزیم PAL می‌تواند به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان نیز در نظر گرفته شود. زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (۲۴).



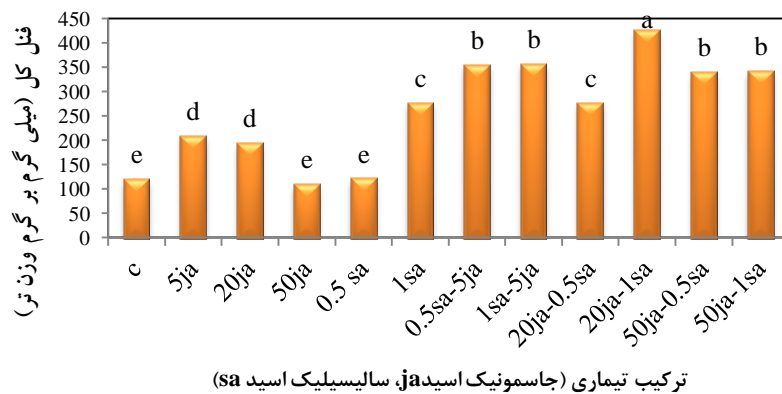
شکل ۴-۲-۳-۶- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم PAL، PAL= ۸۴/۹

LSD=

جدول ۴-۳-۲ پیوست تجزیه واریانس صفات فنل کل، فلاونوئید، فلاونول، پروتئین محلول، کلروفیل a و b و کارتنوئید را نشان می‌دهد نتایج نشان داد که محلول پاشی با احتمال ۹۹ درصد بر کلیه صفات اثرگذار بوده است.

#### ۴-۳-۲-۷ فنل کل

محلول پاشی سبب افزایش غلظت فنل کل در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد شد، نکته حائز اهمیت آن است که میزان افزایش فنل کل بیشتر در تیمارهای ترکیبی نسبت به استفاده‌ی جداگانه آنها مشاهده گردید (شکل ۴-۳-۲-۷)؛ بیشترین میزان فنل کل نیز در تیمار ترکیبی 20ja-1sa با میانگین ۴۲۳/۷ میلی‌گرم بر گرم بافت تر مشاهده گردید. جدول ۶ پیوست همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تغییرات PAL و فنل کل نشان داد.

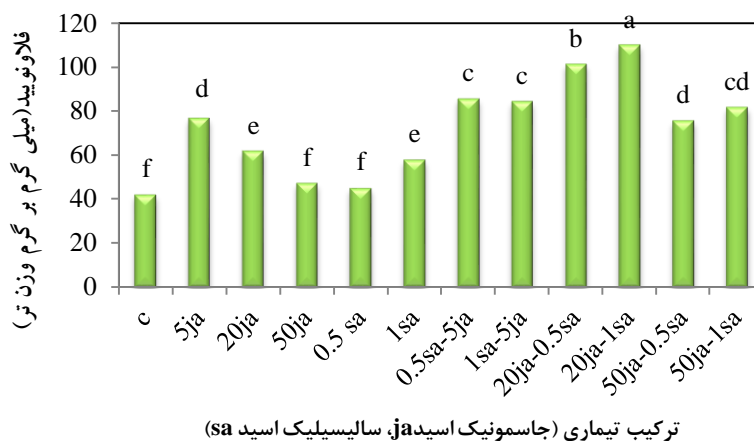


شکل ۴-۳-۲-۷- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان فنل کل، LSD= ۲۱

#### ۴-۳-۲-۸ روند تغییرات فلاونوئید

شکل ۴-۳-۲-۸ روند تغییرات میزان فلاونوئید را تحت اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد محلول پاشی سبب افزایش غلظت فلاونوئید در بیشتر تیمارها (۹ تیمار) نسبت

به شاهد گردید. بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار 2ja-1sa با میانگین‌های ۱۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید.



شکل ۴-۳-۲-۸- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان فلاونوئید، ۶/۱۲  
LSD=

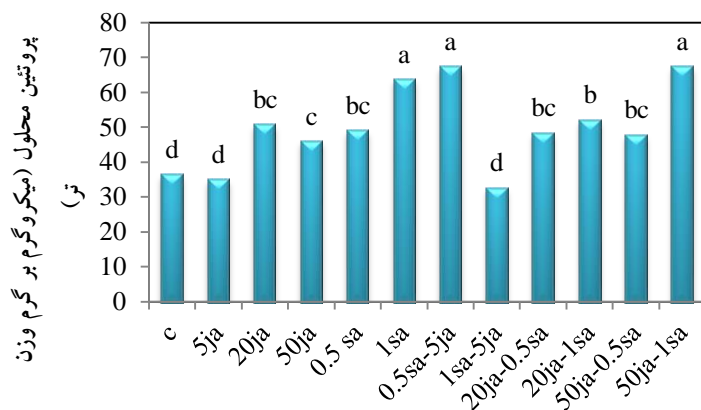
فنیل پروپانوئیدها، مولکول‌های کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات از مسیر بزرگ فنیل پروپانوئیدی سنتز می‌شوند (۲۸). مسیر اصلی بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها، از مسیر شیکمیک اسید (مسیر بیوسنتزی آمینواسیدهای حلقوی مانند فنیل آلانین و تیروزین) و مسیر مالونیک اسید شروع می‌شود. در ساخت بیشتر ترکیبات فنلی در گیاه مسیر شیکمیک اسید اهمیت دارد. استویا دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد قند خون و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌باشد گزارش شده است که این خواص به سبب حضور ترکیبات فنلی در استویا می‌باشد که دارای خاصیت ربایش و پالایش رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۲۱). محققین وجود یک رابطه مثبت بین استعمال خارجی متیل جاسمونات و سنتز ترکیب‌های فنلی، را به عنوان بخشی از واکنش دفاعی گیاه گزارش نمودند (۱۲۱). کاربرد متیل جاسمونات مقدار ترکیبات فنلی را در برخی از گیاهان نظیر سیب-زمینی، مارچوبه و لوبیا سبز افزایش داده است. محققین علت افزایش ترکیبات فنلی در تیمار با متیل-جاسمونات را اثر این ماده بر فعالیت آنزیم PAL و افزایش فعالیت این آنزیم نسبت دادند از آن جا که این آنزیم یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌باشد به نظر می‌رسد که در تحقیق حاضر نیز افزایش فعالیت این آنزیم یکی از دلایل افزایش مقدار ترکیبات فنلی در گیاه استویا باشد. ترکیبات فنلی

به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل پالایش رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، شلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات با دادن هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپید ممانعت می‌کنند (۹۰). در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیبات فیتوفنولیک بخصوص پلی‌فنل‌ها در کاهش سم‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار کارآمد عمل کرده و به عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربات گلوکاتیون در دفع رادیکال‌های پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند. وقتی فنل‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در این واکنش‌ها شرکت می‌کنند، به رادیکال فنوکسیل اکسید می‌شوند. رادیکال فنوکسیل از طریق واکنش با آسکوربات به حالت اولیه بر می‌گردند (۱۸۶).

#### ۹-۲-۳-۴ پروتئین محلول

مقایسه میانگین روند تغییرات پروتئین محلول در شکل ۹-۲-۳-۴ ارائه شده است. محلول پاشی سبب افزایش پروتئین محلول در اغلب تیمارها (۹ تیمار) نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان پروتئین محلول در تیمارهای 1sa، 5ja-0.5 sa و 5ja-1sa با میانگین حدود ۶۵ میکروگرم بر گرم وزن تر و در تیمار شاهد ۳۶/۲ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید. افزایش میزان پروتئین‌ها در نتیجه استعمال اسید جاسمونیک و سالیسیلیک ممکن است به دلیل فعال شدن مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و در نتیجه سنتز بیشتر آنزیم‌های شرکت کننده در این مسیر باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جز پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش محسوب می‌شوند و افزایش غلظت آنها منجر به افزایش پروتئین می‌شود. افزایش محتوای پروتئین تحت تنش القا شده ناشی از محلول‌پاشی با هورمون‌ها می‌تواند به علت افزایش سنتز برخی آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین سنتز پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی سلول باشد. افزایش محتوای پروتئین به وسیله‌ی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر جاسمونات‌ها ممکن است به علت افزایش تشکیل شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار یا خشن باشد که محیط مناسبی را برای افزایش پلی‌ریبوزم mRNA فراهم می‌کند.





ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

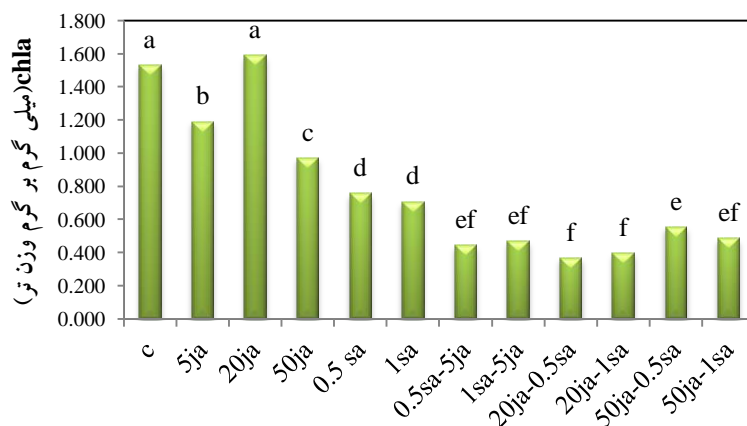
شکل ۴-۲-۳-۹- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت پروتئین محلول،

LSD= ۵/۲۶

#### ۴-۲-۳-۱۰- کلروفیل a

مقایسه میانگین تغییرات کلروفیل a در شکل ۴-۲-۳-۱۰ ارائه شده است. محلول پاشی در ۱۰

تیمار میزان کلروفیل a کمتری نسبت به شاهد نشان داد.



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۲-۳-۱۰- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت chl a، ۰/۱۳

LSD=

#### ۴-۲-۳-۱۱- کلروفیل b و کارتنوئید

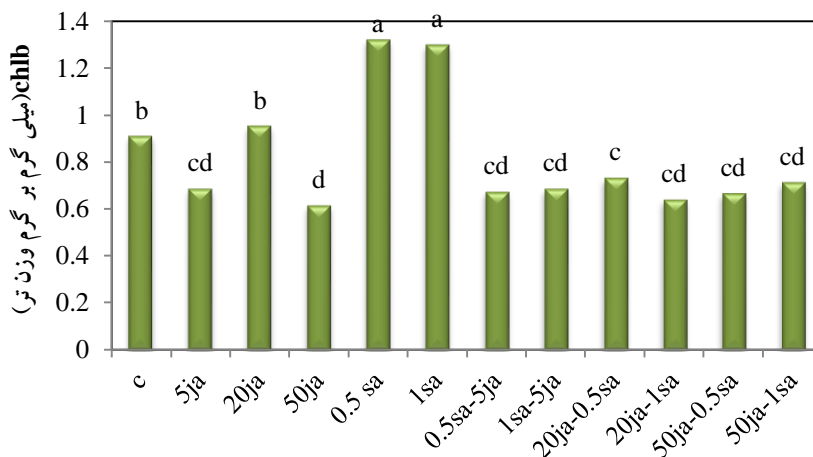
مقایسه میانگین تغییرات کلروفیل b در شکل ۴-۲-۳-۱۱ نشان داده شده است. میزان کلروفیل

b در تیمارهای 0.5 sa و 1sa بیشتر از شاهد بود و بقیه تیمارها میزان کلروفیل b کمتری را نسبت به

شاهد نشان دادند؛ اما غلظت کارتنوئید در ۹ تیمار از تیمار شاهد بیشتر بود (شکل ۴-۲-۳-۱۲).

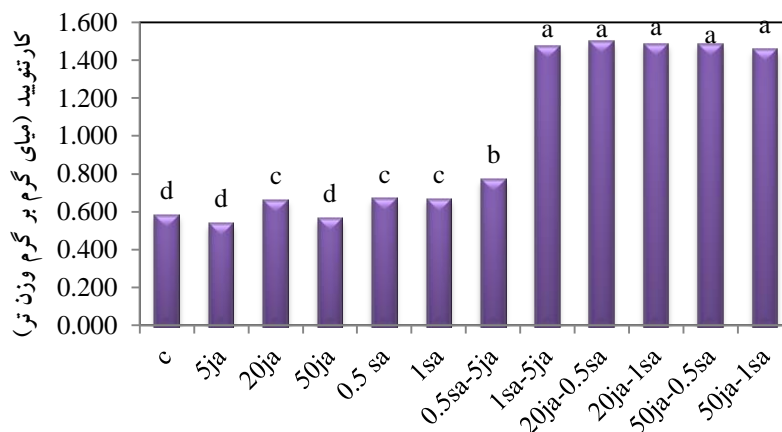
بیشترین میزان کارتنوئید نیز در تیمارهای 50 ja-0.5 sa، 20 ja-1 sa، 50ja-1 sa، 50 ja-0.5 sa و 20 ja-0.5 sa و 5

ja-1 sa با میانگین حدود ۱/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید؛ همه‌ی این تیمارهایی که بیشترین میزان غلظت کارتنوئید در آنها مشاهده شد ترکیبی بودند.



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۲-۱۱- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر غلظت chl b، LSD= ۰/۱۱



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۲-۱۲- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان کارتنوئید، LSD= ۰/۰۷۹

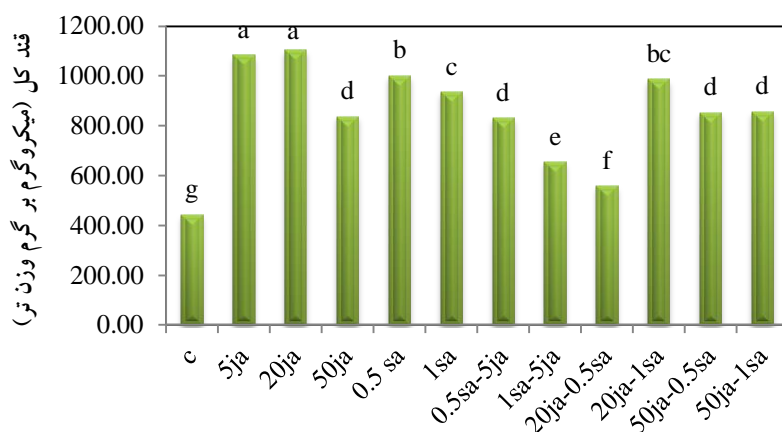
در مورد نقش اسید جاسمونیک بر میزان کلروفیل گزارشات متفاوتی ارائه شده است؛ در گیاه آرابیدوپسیس، ۷ روز پس از اعمال تیمار با متیل جاسمونات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار محتوای کلروفیل a و b کاهش یافته و میزان انتقال الکترون فتوسنتز دو نیز تأثیر پذیرفت (۱۳۰). گزارش شده است که محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک در گیاه سرخارگل سبب افزایش کلروفیل a و b گردید (۱۵ و ۱۶). در لاله، تحریک و تشکیل کلروفیل a و b با استفاده از متیل جاسمونات در حضور نور گزارش شده است (۲۰۶). متیل جاسمونات در بیان یکسری از ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل

از طریق تشکیل آمینولولولینیک اسید دخالت دارد که این امر در غلظت‌های پایین متل جاسمونات مشاهده می‌گردد. در این آزمایش تقریباً همه‌ی تیمارها میزان کلروفیل a کمتری را نسبت به شاهد نشان دادند. هر دو هورمون اثر بازدارندگی و منفی را بر میزان کلروفیل a ایجاد نمودند. محلول پاشی غلظت کارتنوئید را در برخی از تیمارها را نسبت به شاهد افزایش داد، این افزایش را می‌توان به پاسخ گیاه در مقابل دریافت القای تنش کاذب ناشی از محلول پاشی نسبت داد زیرا کارتنوئیدها جزئی سیستم-های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی گیاه می‌باشند.

جدول ۳-۲-۳-۴ تجزیه واریانس صفات کلروفیل کل، RWC، قند کل و ارتفاع را نشان می‌دهد نتایج نشان داد که محلول پاشی با احتمال ۹۹ درصد بر کلیه صفات اثرگذار بوده است. شایان ذکر است که برای مقادیر ریبودیوزاید A، استویوزاید و استویول برای سطوح شاهد، 50ja و 20 ja اندازه‌گیری شد و از انحراف معیار تکرارها به عنوان Error bar استفاده شد.

#### ۳-۲-۳-۴ قند کل

مقایسه‌ی میانگین قند کل در شکل ۳-۲-۳-۴ ارائه شده است. محلول پاشی سبب افزایش قند کل در همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد گردید. افزایش میزان قندها تحت تنش می‌تواند سبب افزایش میزان ترکیبات دفاعی گردد و یا اینکه بعد از خاموش شدن مسیر سیگنال‌دهی و مدت اثر اسید جاسمونیک گیاه به حالت عادی برگشته باشد که افزایش میزان قندها سبب افزایش میزان عملکرد وزن خشک برگ و ساقه گردید (شکل‌های ۳-۲-۳-۴ و ۳-۲-۳-۴).



ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

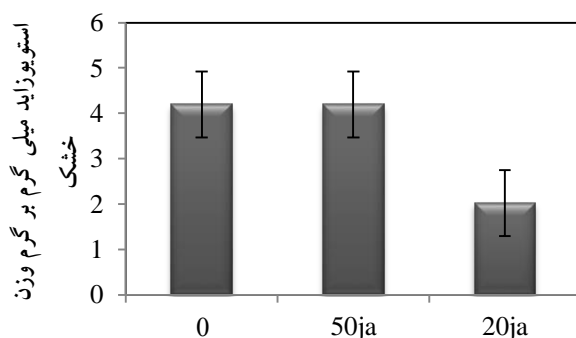
شکل ۴-۳-۲-۱۳- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان قند کل، ۶۱/۵

LSD=

دسته‌ی دوم از متابولیت‌های ثانویه که در استویا بررسی شد گلیکوزیدهای استویول بود که تنها در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana*) تولید می‌شود، گلیکوزیدها شکلی از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای تنوع ساختاری وسیعی می‌باشند و در مواردی در متابولیسم اولیه گیاهان نیز ایفای نقش می‌کنند.

#### ۴-۳-۲-۱۳ استویوزید

میانگین‌های مربوط به استویوزاید برای ۲ تیمار و شاهد در شکل ۴-۳-۲-۱۴ آورده شده است. میزان استویوزاید در تیمار 20 ja کمتر از شاهد و تیمار 50 ja بود.



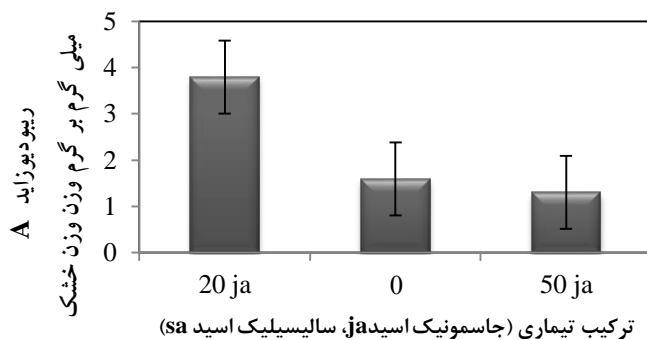
ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۲-۱۴- میانگین‌های سه تیمار تحت اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان

استویوزاید

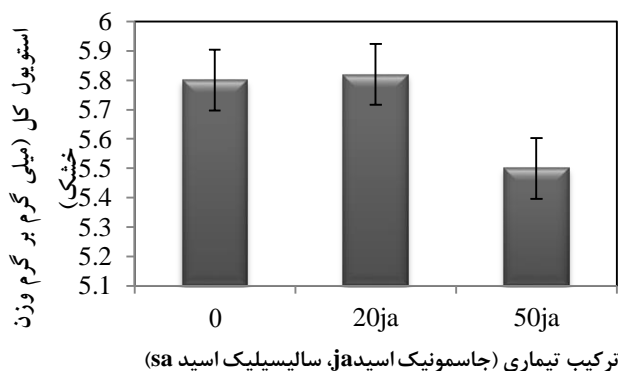
### ۴-۳-۲-۱۴ میزان ریبودیوزاید A و استویول

شکل ۴-۳-۲-۱۵ میانگین‌های سه تیمار تحت تأثیر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان ریبودیوزاید A را نشان می‌دهد. در غلظت ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک میزان تولید گلیکوزید ریبودیوزاید A نسبت به شاهد افزایش یافت. اما با افزایش غلظت اسید جاسمونیک به ۵۰ میکرومولار میزان آن کاهش یافت. شکل ۴-۳-۲-۱۶ میانگین‌های سه تیمار تحت تأثیر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان استویول را نشان می‌دهد. میزان استویول در تیمار شاهد و غلظت ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک بیشتر از غلظت ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک بود.



شکل ۴-۳-۲-۱۵- میانگین‌های سه تیمار تحت اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان

### ریبودیوزاید A

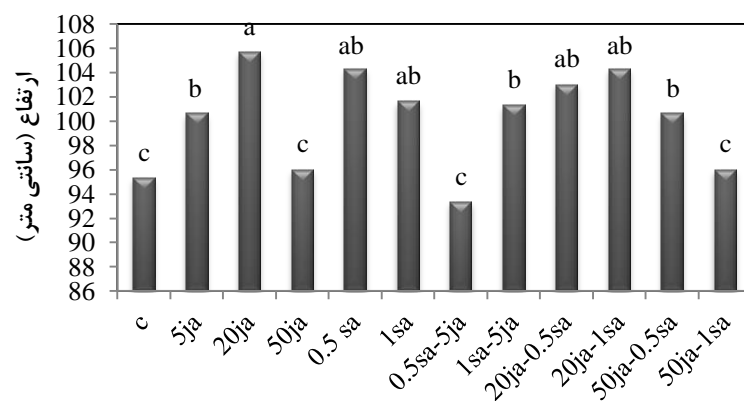


شکل ۴-۳-۲-۱۶- میانگین‌های سه تیمار تحت اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان استویول در این پژوهش اثر تحریک‌کنندگی اسید جاسمونیک و سالیسیلیک سبب تغییر در میزان گلیکوزیدهای استویوزاید و ریبودیوزاید A شد. تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک بر میزان ریبودیوزاید A اثر بیشتری نسبت به شاهد و غلظت ۵۰ میکرومولار اسید جاسمونیک داشت از آنجا که

این گلیکوزید در گیاه استویا دارای مزه و طعم بهتری است و تلخی ندارد و بسیاری از تلاش‌ها در جهت افزایش این ترکیب می‌باشد این افزایش می‌تواند بسیار سودمند باشد. ریبودیوزاید A از استویوزاید ساخته می‌شود، احتمالاً اسید جاسمونیک توانست واکنش‌های مسیر سنتز استویوزاید و ریبودیوزاید A را سرعت بخشد به ویژه بر سرعت تبدیل استویوزاید به ریبودیوزاید A اثر گذار بوده، و یا اینکه احتمال دارد تیمارهایی نظیر اسید جاسمونیک سبب بیان گلیکوزیل ترانسفرازهایی شود که سبب ساخت گلیکوزیدها می‌گردد. این تأثیر در غلظت ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک بیشتر بود. نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسید جاسمونیک بر میزان تولید تاکسول در گیاه سرخدار نشان داده است که تیمار ۱۰ میکرومولار اسید جاسمونیک سبب افزایش تاکسول تا بیش از سه برابر می‌شود در حالی که تولید این ماده در گیاهان شاهد و در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار کمتر بوده است (۱۸۲).

#### ۴-۳-۲-۱۵ ارتفاع ساقه

نتایج تجزیه واریانس جدول ۳-۴-۲-۳ پیوست نشان داد که محلول‌پاشی اثر مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان ارتفاع ساقه نشان داد؛ بیشترین میزان ارتفاع ساقه در تیمار 20ja با میانگین ۱۰۵/۷ سانتی‌متر مشاهده شد، افزایش ارتفاع می‌تواند با افزایش تعداد برگ و افزایش فرصت ذخیره مواد فتوسنتزی همراه باشد و در نهایت افزایش عملکرد را در گیاه به همراه داشته باشد. افزایش ارتفاع ساقه می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه باشد.



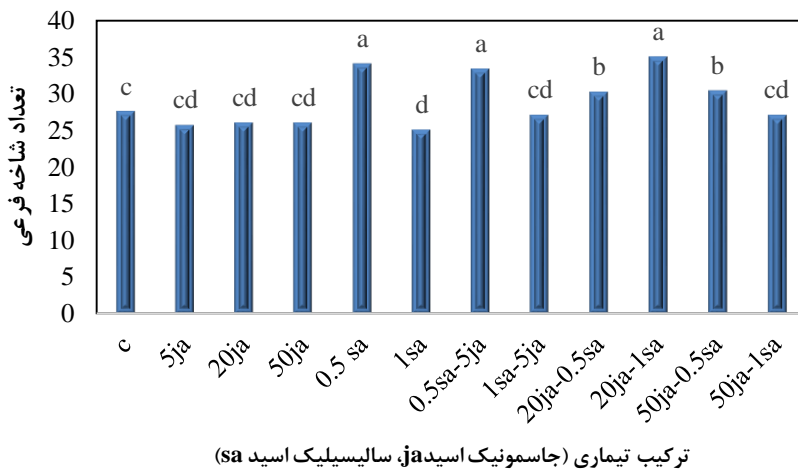
ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید ja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۲-۱۷- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان ارتفاع، LSD= ۴/۲

جدول ۳-۴-۳-۲ تجزیه واریانس پیوست صفات شاخه فرعی، وزن خشک ساقه و برگ را نشان می‌دهد  
 نتایج نشان داد که محلول پاشی با احتمال ۹۹ درصد بر کلیه صفات اثرگذار بوده است.

### ۳-۴-۲-۱۶ شاخه‌های فرعی

شکل ۳-۴-۲-۱۸ مقایسه میانگین تعداد شاخه‌های فرعی را تحت اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد؛ بیشترین تعداد شاخه فرعی در تیمارهای ۰.۵ sa ، ۱sa-20ja و ۵ja-0.5 sa با میانگین ۳۴ عدد و در تیمار شاهد با میانگین ۲۷/۵ عدد مشاهده شد. افزایش تعداد شاخه‌ها می‌تواند با افزایش تعداد برگ همراه باشد که در نهایت می‌تواند سبب افزایش عملکرد گردد.

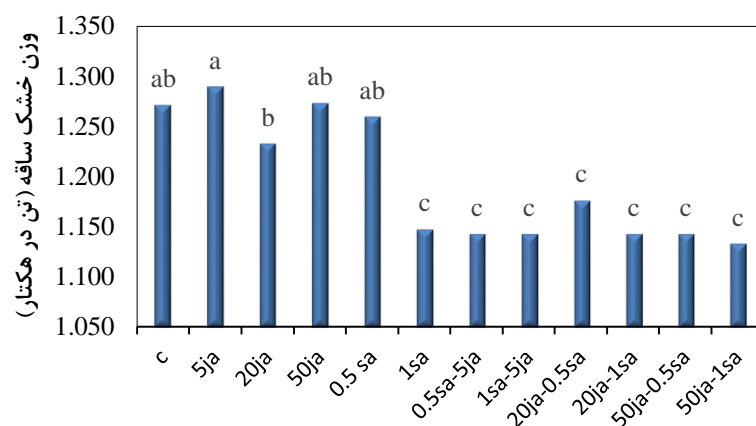


شکل ۳-۴-۲-۱۸ مقایسه میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر تعداد شاخه فرعی، ۲/۵۳

LSD=

### ۳-۴-۲-۱۷ وزن خشک ساقه

شکل ۳-۴-۲-۱۹ مقایسه میانگین وزن خشک ساقه را تحت اثر محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک نشان می‌دهد. محلول پاشی در اغلب تیمارها میزان وزن خشک ساقه کمتری را نسبت به شاهد نشان داد.



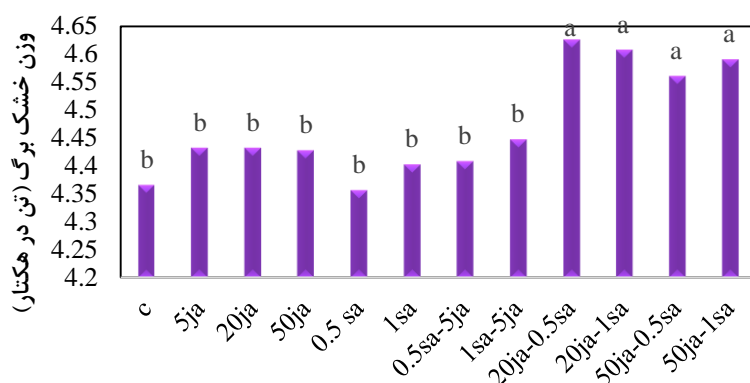
ترکیب تیماری (jasمونیک اسیدja، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۲-۱۹- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر وزن خشک ساقه، ۰/۰۵  
LSD=

#### ۴-۳-۲-۱۸ وزن خشک برگ

شکل ۴-۳-۲-۲۰ روند تغییرات وزن خشک برگ استویا تحت اثر محلول‌پاشی نشان می‌دهد؛ بیشترین میزان وزن خشک برگ در تیمارهای 20ja-1sa، 20ja-0.5 sa و 50ja-1sa و 50ja-0.5sa با میانگین حدود ۴/۶ تن در هکتار مشاهده گردید. محلول‌پاشی علی‌رغم اینکه در میزان کلروفیل‌ها اثری نداشت احتمالاً بدلیل افزایش توان سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در استویا سبب افزایش دوام برگ و به تأخیر انداختن پیری و زوال برگ در برخی تیمارها گردیده و بدنبال آن سبب افزایش وزن خشک برگ استویا در آنها گردید. مکان اصلی فتوسنتز، برگ‌های سبز گیاهان می‌باشد که میزان تولید آنها بستگی به فعالیت رنگدانه‌های فتوسنتزی به ویژه کلروفیل، جذب نور و توانایی گیاه در تثبیت CO<sub>2</sub> دارد (۲۸). وزن کل اندام هوایی و عملکرد گیاهان رابطه مستقیمی با میزان فتوسنتز دارد و افزایش کارایی فتوسنتز می‌تواند منجر به افزایش عملکرد شود (۱۶۹، ۸۰ و ۹۶).





ترکیب تیماری (جاسمونیک اسید a، ج، سالیسیلیک اسید sa)

شکل ۴-۳-۲-۲۰- مقایسه‌ی میانگین اثر اسید جاسمونیک و سالیسیلیک بر وزن خشک برگ، ۱/۰

LSD=

### ۴-۳-۲ نتیجه‌گیری کلی

۱- محلول پاشی با اسید جاسمونیک و سالیسیلیک سبب القای تنش کاذب در استویا و برانگیختن سیستم دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه گردید، محلول پاشی سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین- آمونیلایز در استویا به ویژه در تیمارهای ترکیبی گردید که به دنبال آن سنتز ترکیبات فنلی در استویا افزایش یافت.

۲- در این پژوهش اثر محرک اسید جاسمونیک و سالیسیلیک و غلظت مؤثر محرک برای تولید گلیکوزیدهای استویوزاید و ریبودیوزاید A مشخص شد. تیمار ۲۰ میکرومولار اسید جاسمونیک بر میزان ریبودیوزاید A اثر افزایشی داشت از آنجا که این گلیکوزید در گیاه استویا دارای مزه و طعم بهتری است و تلخی ندارد و بسیاری از تلاش‌ها در جهت افزایش این ترکیب می‌باشد این افزایش می‌تواند بسیار سودمند باشد. بنابراین نتیجه حاصل از تیمار اسید جاسمونیک مؤثر بودن آن در غلظت‌های پایین است. از آنجا که افزایش گلیکوزیدها در اثر اسید جاسمونیک احتمال دفاعی بودن این ترکیبات را قوت می‌بخشد افزایش ترکیبات دفاعی در کوتاه مدت می‌تواند گیاه را در مقابل حشرات مصونیت می‌بخشد. از طرفی چون تولید متابولیت ثانویه و به طور کلی آمادگی گیاه برای مقابله و دفاع از رشد و متابولیسم اولیه می‌کاهد، همان‌طور که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد محلول پاشی سبب کاهش میزان کلروفیل در استویا گردید، بنابراین مسیر پیام رسانی اسید جاسمونیک پس از علامت‌دهی باید خاموش شود، زیرا

افزایش وزن خشک برگ در اغلب تیمارها نسبت به شاهد مشاهده شد که باید ناشی از برگشت گیاه به حالت عادی باشد.

۳- محلول پاشی سبب افزایش وزن خشک برگ (عملکرد) نسبت به شاهد شد که می‌تواند افزایش ماده‌ی مؤثره در واحد سطح را به همراه داشته باشد.

#### ۴-۳-۲ پیشنهادات

- ۱- با توجه به نتایج به دست آمده اسید جاسمونیک اثر فزاینده بر میزان گلیکوزیدهای استویا دارد که دفاعی بودن این ترکیبات را پیشنهاد می‌کند. البته میزان تغییرات در نسبت دو نوع گلیکوزید بیشتر مشهود بود. بنابراین مطالعه و بررسی واکنش‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی این مسیر توصیه می‌گردد.
- ۲- سنجش ترکیبات مختلف اعم از پیش سازها، ترکیبات حد واسط، متابولیت‌های انتهایی مسیر اصلی و سایر مسیرهای مرتبط و همچنین ژن‌های مرتبط نظیر ژن‌های مسیر اسید جیبرلیک، گلیکوزیل ترانسفرازها و سایر ژن‌های پاسخ‌گر به اسید جاسمونیک نتایج دقیق‌تر و مؤثقتری را خواهد داد.

## منابع

۱. آقاعلیخانی م. (۱۳۹۱) "سرخارگل، گیاه ایمنی بخش (ترجمه)" انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ص ۱۵۳.
۲. اردکانی م. و نادورا. (۱۳۸۸) "اصول و فنون کاربردی برای متخصصان علوم گیاهی (ترجمه)" انتشارات دانشگاه تهران.
۳. افضلی س ف.، شریعتمداری م.، حاجعباسی و. و معطر ف. (۱۳۸۶) "اثر تنش شوری و خشکی بر گلدهی، عملکرد، اگلیکوزید-های افلانولی در (*Matricaria chamomilla* L.)" مجله گیاهان دارویی و معطر ۲۳ (۳): ۳۸۲-۳۹۰.
۴. اکرم قادری ف.، کامکار ب. و سلطانی ا. (۱۳۸۸) "علوم و تکنولوژی بذر (ترجمه)" انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ص ۱۸۰.
۵. اکرم قادری، ف. (۱۳۸۸) پایان نامه دکترا: "مطالعه نمو کیفیت بذر، جوانه‌زنی، طول عمر و زوال بذر در برخی گیاهان دارویی: کدو تخم کاغذی (*Cucurbita pepo. convar. var. styriaca*)، سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) و گاو زبان (*Borago officinalis* L.)". دانشکده تولید دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۸۰ صفحه.
۶. امیدبیگی ر. (۱۳۸۱) "بررسی کشت و سازگاری سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) در شمال تهران" علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۲۴۰-۲۳۰: (۲) ۶.
۷. اسماعیل‌زاده بهابادی ص. و شریفی م. (۱۳۹۲) "افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی" مجله‌ی سلول و بافت، ص ۱۲۸.
۸. انتشاری ش.، رفیعی ص. و قاسمی پیربلوطی ع. (۱۳۹۳) "تأثیر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر میزان اسانس در گیاه آویشن باغی" فرآیند و کارکرد گیاهی، ۳ (۸) ۹۵-۹۰.
۹. بنایان، م. (۱۳۸۱) "ساخت و کاربرد مدل‌های شبیه‌سازی در کشاورزی" انتشارات مشهد (۱): ۳۵-۵۵.
۱۰. حاجی‌مهدی‌پور ه.، خانوی م.، شکرچی م.، عابدی ز. و پیرعلی همدانی م. (۱۳۸۸) "بررسی بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی در سرخارگل" فصل‌نامه گیاهان دارویی، ۸: ۱۴۵-۱۵۲.
۱۱. حسینی ف. (۱۳۸۷) پایان‌نامه ارشد: "بررسی اثر زوال بذر بر جوانه‌زنی، استقرار و عملکرد پنج رقم کلزا در شرایط آب و هوایی اهواز" دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی اهواز، ص ۲۵۸.
۱۲. خدابخشی ام.، کامکار ب. و خلیلی ن. (۱۳۹۴) "کمی سازی واکنش سرعت جوانه‌زنی گیاه دارویی مرزه به دما و پتانسیل آب با استفاده از مدل‌های رگرسیون غیرخطی" مجله به زراعی کشاورزی، ۱۷ (۱): ۲۲۹-۲۴۰.
۱۳. خلیلی ن. (۱۳۹۱) پایان‌نامه‌ی ارشد: "پیش‌بینی سبز شدن گیاه جو *Hordeum vulgare* L. در واکنش به دما، رطوبت و عمق کاشت"، دانشکده تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۱۴. رسولی ف. (۱۳۹۰) پایان‌نامه ارشد: "بررسی اثر تنش غرقابی بر خصوصیات فیزیولوژیک، عملکرد و اجزای عملکرد کلزا" دانشکده تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۱۵. رسولی ف.، قلی‌پور م.، جهان‌بین ک. و اصغری ح ر. (۱۳۹۶) "اثر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر برخی آنتی-اکسیدان‌ها، قند محلول و پراکسیداسیون لیپید در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در شرایط مزرعه‌ای". پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۵ (۱): ۴۵-۶۱.
۱۶. رسولی ف.، گالشی.، پیردشتی ه. و زینلی ا. (۱۳۹۳) "بررسی اثر تنش غرقابی بر عملکرد و اجزای عملکرد کلزا" تولید گیاهان زراعی گرگان، (۲) ۷: ۲۳-۴۲.
۱۷. رسولی ف.، قلی‌پور م.، جهان‌بین ک. و اصغری ح ر. (۱۳۹۵) "اثر جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بر عملکرد و برخی اجزای عملکرد سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) همایش ملی گیاهان دارویی (تحقیقات، تولید و فرآوری). دانشگاه صنعتی شاهرود - دانشکده کشاورزی ص ۳۰.
۱۸. رسولی ف.، قلی‌پور م.، جهان‌بین ک. و اصغری ح ر. (۱۳۹۵) "اثر محلول پاشی جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید بر برخی عوامل روزنه‌ای و محتوای رطوبت نسبی برگ در سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) همایش ملی گیاهان دارویی (تحقیقات، تولید و فرآوری) دانشگاه صنعتی شاهرود - دانشکده کشاورزی ص ۴۰.
۱۹. رؤف فرد ف.، شریفی م.، امیدبیگی ر.، سفیدکن ف.، بهمنش م. و احمدی ن. (۱۳۹۳) "اثر متیل جاسمونات بر آنزیم‌های متابولیسمی و مواد فنلی در گیاه دارویی (*Agastache foeniculum* [Pursh] Kuntze) آگاستاکه" ماهنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر/ایران ۳۰ (۳)، ص ۳۹۶.
۲۰. سلطانی ا. و مداح و. (۱۳۸۹) "برنامه‌های کاربردی ساده برای آموزش و پژوهش در کشاورزی" انجمن علمی بوم‌شناختی ایران، ص ۷۲.
۲۱. سالاری ف. و منصوری ر. (۱۳۹۱) "بررسی اثر جاسمونیک اسید بر ترکیبات ترپنوییدی در گیاه شاهدانه (*Cannabis Sativa* L.) در مرحله‌ی رویشی" فرآیند و کارکرد گیاهی ۱ (۲): ۵۱-۶۰.
۲۲. سلطانی ا. (۱۳۹۴) "طرح و آنالیز آزمایشات کشاورزی با SAS" انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۴۳۱.
۲۳. صالحیان خ. (۱۳۷۴) پایان‌نامه ارشد: "اثر قدرت بذر بر سبز کردن، نمو و عملکرد دانه گندم" دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ص ۱۲۱.
۲۴. صمدی ص.، قاسم‌نژاد ع. و علیزاده م. (۱۳۹۳) "تغییرات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) تحت تأثیر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای" پژوهش‌های تولید گیاهی گرگان، ۲۱ (۴): ۱۳۵-۱۴۸.
۲۵. عبدالزاده ا. و اقدسی م. (۱۳۷۹) "فیزیولوژی گیاهی (ترجمه)"، انتشارات مخطوم‌قلی فراقی، ص ۵۰.

۲۶. قادری فر. ف. و سلطانی ا. (۱۳۸۹) "کنترل و گواهی بذر" انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ص ۱۳۵.
۲۷. قاسمی گلعدانی ک.، صالحیان م.، رحیمزاده خوی ف. و مقدم م. (۱۳۷۵) "اثر قدرت بذر بر سبز شدن گیاهچه گندم و عملکرد دانه گندم" *علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری*، ۳ (۳): ۴۸-۵۶.
۲۸. کافی م.، زند ا.، کامکار ب.، مهدوی دامغانی ا.، عباسی ف. و شریفی ه. ر. (۱۳۸۸) "فیزیولوژی گیاهی (ترجمه)" انتشارات جهاد دانشگاهی فردوسی مشهد ص ۴۵۰.
۲۹. کامکار ب.، گرزین ا.، خلیلی ن. و قربانی م. (۱۳۹۴) "گمی سازی و تعیین پارامترها و دامنه های پاسخ به دمای بذر و گیاهچه گیاه آزیوش (*Corchorus olitorius* L.) با استفاده از مدل های رگرسیون غیرخطی" *به زراعی کشاورزی*، ۱۷ (۱): ۲۱۰-۲۲۸.
۳۰. کوره پز س. (۱۳۸۰) پایان نامه ارشد: "بررسی امکان کشت و اهلی کردن گیاه دارویی سرخارگل در شرایط آب و هوایی مشهد" دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۸۴.
۳۱. گالشی س.، فرزانه س.، سلطانی ا. و رضایی ج. (۱۳۸۵) "ارزیابی واکنش چهل ژنوتیپ پنبه به تنش خشکی در مرحله جوانه زنی" *علوم کشاورزی و منابع طبیعی*، جلد ۱۳. ۵۷-۴۲.
۳۲. گالشی س.، ترابی ب.، رسام ق.، راحمی کاریزکی ع. و بزرگر ا. (۱۳۸۸) "تنش و مدیریت آن در گیاهان" انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۲۰.
۳۳. مرادپینودی ک.، شریفی م. و بهمنش م. (۱۳۹۳) "تأثیر متیلیل ژاسمونات بر میزان استویوزاید و ربادیوزید A و بیان ژن کائورنوئیک اسید ۱۳-هیدروکسیلاز در گیاه استویا در شیشه" *زیست شناسی گیاهی ایران*، سال ششم، ش ۲۱، ۹۹-۱۱۰.
۳۴. نوذری نژاد م. (۱۳۹۱) پایان نامه کارشناسی ارشد: "پیش بینی سبز شدن گیاه گندم در واکنش به دما، پتانسیل آب و عمق کاشت" دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۸۰ صفحه.
۳۵. یوسفی داز م. (۱۳۸۳). پایان نامه کارشناسی ارشد: "پیش بینی سبز شدن گیاه نخود در واکنش به دما و عمق کاشت" دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ص ۱۰۵.
36. Adda A., Regagb Z., Latigui A. and Merah O. (2014) "Effect of salt stress on  $\alpha$ -amilase activity, sugars mobilization and osmotic potential of *Phaseolus vulgaris* L. Seed var. Cocorose during germination" *Journal of biological Science*. 14: 370-375
37. Agrawal R. (2003) "Seed technology", *Publication. Co. PVT. LTD. New Delhi. India* 64: 229- 236
38. Akkol E. K., Goger F., Kosar M. and Baser K. H. (2008) "Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey". *Food Chemistry* 108: 942-949.

39. Almansouri M., Kinet J.M. and Lutts S. (2001) "Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.)" *Plant Soil*, 231: 243-254.
40. Alvarado V. and Bradford K.J. (2002) "A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination" *Plant Cell Environment*. 25: 1061-1069.
41. Ament K., Kant M., Sabelis M.W., Haring A.H. and Schuurink R.C. (2004) "Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission" *Plant Physiology*, 135: 2025-2037.
42. Anda A. and Pinter L. (1994) "Sorghum germination and development at influenced by soil temperature and water content" *Agronomy Journal*. 86: 621-624.
43. Andre C.M., Schafleitner R., Legay S., Lefèvre I., Aliaga C.A., Nomberto G., Hoffmann L., Hausman J.F., Larondelle Y. and Evers D. (2009) "Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress" *Phytochemistry*, 70(9): 1107-1116.
44. Apel K. and Hirt H. (2004) "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction" *Plant Biology*., 55: 373-399.
45. Arnold C.Y. (1959) "The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system" *Journal of American Society of Horticultur Science*. 74: 430-445.
46. Arnon D.I. (1949) "Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*" *Plant Physiology. Rockville*, 24: 1-24.
47. Ashok Kumar Yadav S., Singh D., Dhyani P. and Ahuja S. (2011) "A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]" *Plant Science*, 91: 1-27.
48. Ashraf M.Y., Azmi A., R.,khan A. H. and Ala S.A. (1994) "Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat". *Acta physiology plantarum*. 16 (3): 185 – 191.
49. Atwater B.R. (1980) "Germination, dormancy, and morphology of the seeds of herbaceous ornamental plants", *Seed Science. Technology*, 8: 523-73.
50. Bagal U.R., Leebens mack J.H., Walter Lorenz W. and Dean J.F.D. (2012) "The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age" *BMC Genoms*. 13: 3. 1471-2164.
51. Bais H P., Park S W., Weir T L., Callaway R. M. and Vivanco J. M. (2004) "How plants communicate using the underground information superhighway", *Trends in Plant Science* 9: 26-32.
52. Baker E.H. and Bradford K. J. (1994) "The fluorescence assay for Maillard product accumulation does not correlate with seed viability", *Seed Science Reserch*, 4: 103-106.

53. Balbaki R.Z., Zurayk R.A., Blek, M.M. and Tahouk S.N. (1999) "Germination and seedling development of drought tolerant and susceptible wheat under moisture stress", *Seed Science Technology*, 27: 291-302.
54. Bange M.P., Milroy S.P. and Thongbai P. (2004) "Growth and yield of cotton in response to waterlogging", *Field Crops Research*, 88: 129-142.
55. Barra L., Pica N., Gouffi K., Walker G.C., Blanco C. and Trautwetter A. (2003) to be efficient "Glucose-6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose Letters 229: 183–188. osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*" *FEMS Microbiology*
56. Baskin J. M. and Baskin C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(01), 1-16.
57. Baskin C.C. and Baskin J.M. (2001) "Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination" *Academic Press, San Diego, California*, pp. 666.
58. Beauchamp C. and Fridovich M. (1971) "Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels" *Analytical Biochemistry*. Nov: 44 (1), 276-287.
59. Berim A., Spring O., Conrad J., Maitrejean M., Boland W. and Petersen M. (2005) "Enhancement of lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum* by coronalon, indanoyl-isoleucine and methyl jasmonate". *Planta* 222 (5): 769-776.
60. Bewley J.D. (1997) "Seed germination and dormancy" *Plant Cell*. 9: 1055-1066.
61. Bewley J.D. and Black M. (1994) "*Seeds: Physiology of Development and Germination*" New York: Second Edition, Plenum Press, 445p.
62. Bi H.H., Zeng R.S., Su L.M., An M. and Luo S.M. (2007) "Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate", *Journal of Chemical Ecology*, 33(5): 1089-1103
63. Biondi S., Scaramagli S., Capitani F., Altamura M.M. and Torrigiani P. (2001) "Methyl jasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers " *Journal of Experimental Botany*, 52(355): 231-242.
64. Blokhina O., Virolainen E. and Fagerstedt K.V. (2003) "Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review" *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- 65- Blumenthal M., Lindstrom A., Lynch M.E. and Rea P. (2011) "Herb sales continue growth-up 3.3% in 2010" *Herbal Gram*. 90: 64-67.
66. Bowles D., Lim E. K., Poppenberger B. and Vaistij F. E. (2006) "Glycosyltransferases of lipophilic small molecules " *Annual Review of Plant Biology*, 57: 567-597.
67. Brader G., Tas E. and Palva E. T. (2001) "Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora* " *Plant Physiology* 126(2): 849-860.

68. Bradford M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- 69- Brar G.S., Gomez J.F., McMichael B.L., Matches A.G. and Taylor H.M. (1991) "Germination of twenty forage legumes as influenced by temperature" *Agronomy Journal*, 83: 173-175.
- 70- Brodford K.J. (2002) "Applications of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy" *Weed Science*, 50: 248-260.
71. Cakmak I. and Marschner H. (1992) "Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves" *Plant Physiology*, 98: 1222-1227.
72. Capitani F., Biondi S., Falasca G., Ziosi V., Balestrazzi A., Carbonera D., Torrigiani P. and Altamura M. (2005) "Methyl jasmonate disrupts shoot formation in tobacco thin cell layers by over-inducing mitotic activity and cell expansion" *Planta*, 220: 507-519.
73. Carlberg I. and Mannervik B. (1985) "Glutathione reductase" *Methods Enzymol.* 113: 484-490.
74. Carmanol F., Sinet P.M., Rapin J. and Jerome H. (1981) "Glutathione S-transferase of human red blood cells assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: hyperbilirubinemia and impaired renal function. *Clinica chimica" Acta.* 117 (3): 209-217.
75. Carter C., Healy R., Otool N.M., Naqvi S.M., Ren G., Park S., Gwyn A.B., Harry T., Horner R. and Thornburg W. (2007) "Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganism" *Plant physiology*, 143: 389-399.
76. Ceunen S., Jan M. and Geuns C. (2013). "Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni)" *Plant Science*, 198: 72– 82.
77. Chance B. and Maehly A.C. (1955) "Assay of catalases and peroxidases" *Methods Enzymol*, 11: 764-755.
78. Chan Z., and Tian S. (2006) "Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizing enzyme and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry" *Postharvest Biology. Technology.*, 39: 314-320.
79. Chen G., Wanga Q., Liu Y., Li Y., Cui J., Liu Y., Liu H. and Zhang Y. (2012) "Modelling analysis for enhancing seed vigour of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Using an ultrasonic technique", *Biomass Bioenergy*, 47: 426 -435.



80. Chen J., Cheng Z. and Zhong S. (2007) "Effect of exogenous salicylic acid on growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress" *Journal of Environment Science*, 19: 44-49.
81. Cheryl-Kaiser C., Geneve R. and Ernst M. (2015) "*Echinacea*. University of Kentucky", Press, 120p.
82. Cheng Z. and Bradford K.J. (1999) "Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments" *Journal of Experiment Botany*: 50, 89–99.
83. Choi D.W., Jung J.D., Ha Y.I., Park H.W., In D.S., Chung H.J. and Liu J.R. (2005) "Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites" *Plant Cell Reports*, 23(8): 557-566.
84. Chinard F.P. (1952) "Photometric estimation of proline and ornithine", *Journal of Biological Chemistry*, 199:91–95.
85. Comparot S.M., Graham C.M. and Reid D.M. (2002) "Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light and dark grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots" *Journal of Plant Growth Regulation.*, 38: 21-30.
86. Cornic G. (2000) "Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - Not by affecting ATP synthesis" *Journal of Trends Plant Science*. 5: 187- 198.
87. Couee I., Sulmon C., Gouesbet G. and Amran A. (2006) "Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants" *Journal of Experimental Botany*. 36: 449-459.
88. Creelman R.A. and Mullet I.E. (1997) "Biosynthesis and action of jasmonate in plants" *Ann. Rev. Plant Physiology.*, 48: 355-381.
89. Deutsch J. (1983) "Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer, editor. *Methods of enzymatic analysis* 3rd english ed", *Weinheim: Verlag Chemie*, 191-197
90. Divya P., Puthusseri B. and Neelwarne B. (2013) "The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compound in foliage of Coriander" *Food Science. Technology*, 56: 101-110.
91. Doughty K. J., Kiddle G. A., Pye B. J., Wallsgrove R. M. and Pickett J. A. (1995) "Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate" *Phytochemistry*, 38(2): 347-350.
92. Du Z. and Bramlage W.J. (1992) "Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts" *Journal of Agricultur and Food Chemistry*. 40: 1566-1570.
93. Eastmond P, Kolacna L, Rawsthorne S. (1996) "Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.)" *Journal of Experimental of Botany* 47: 1763–1769

94. Elamrani A., Raymond P. and Saglio P. (1992) "Nature and utilization of seed reserves during germination and heterotrophic growth of young sugar beet seedlings", *Seed Science Reserch*, 2(01): 1-8.
95. Esfandiari A., Shakiba M. R., Mahjob S. and Aliari h. (2009) "Seed storage and its role in wheat seedling production" *Journal of Agricultural Science*, 19 (1): 63-75.
96. Faver K.L., Gerik T.J. and Percy R.G. (1997) "Modern Pima cotton cultivars have higher photosynthetic capacity than obsolete varieties. In: The proceedings of Beltwide cotton conference" *New Orleans, LA, USA*. 1499-502.
97. Firenzuoli A.M., Vanni P., Ramponi G. and Baccari V. (1968) "Changes in Enzyme Levels during Germination of Seeds of *Triticum durum*". *Plant Physiology*. 43: 260-264.
98. Foley M.E. and Fennimore S.A. (1998) "Genetic basis for seed dormancy" *Seed Science. Reserch*, 8: 173-179.
99. Forcella F., Benech Arnold R.L., Sanchez R. and Ghera C.M. (2000) "Modeling seedling emergence" *Field Crop Reserch*, 67:123-139.
100. Foti S., Cosentino S.L., Patane C. and Agosta G.M.D. ( 2002) "Effects of osmoconditioning upon seed germination of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) under low temperatures", *Seed Science and Technology*, 30(3): 521-533.
101. Foyer C H and Noctor G. (2011) "Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub", *Plant Physiologyl*, 155(1): 2-18.
102. Foyer C., Rowell J. and Walker D. (1983) "Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination" *Planta*, 157: 239-244.
103. Goldraij A. and Polacco J.C. (1999) "Arginase is inoperative in developing soybean embryos" *Plant Physiology*, 119: 297-303
104. Gonzalez-Aguilar G.A., Tiznado-Hernandez M.E., Zavaleta-Gatica R. and Martinez-Tellez M.A., (2004) "Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits", *Biochemistry. Biophysic Reserch Communications*, 313(3): 694-701.
105. Greenberg D.M. (1955) "Enzymes of protein metabolism" *Methods Enzymol* 2:368-374
106. Grubb C. D., Zipp B. J., Ludwig-Müller J., Masuno M. N., Molinski T. F. and Abel S. (2004) " *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis" *The Plant Journal*, 40(6): 893-908.
107. Grundy A.C., Phelps K., Reader R.J. and Burston S. (2000) "Modeling the germination of *Stellaria media* using the concept of hydrothermal time" *New Phytologist*, 148: 433-444.
108. Guerke W.R., Gutormson T., Meyer D., Mc Donald M., Mesa J.C., Robinson J.C. and Tekrony D. (2004) "Application of hydrottime analysis in seed testing" *Seed Technology*, 26 (1): 75-85.

109. Guglieminetti L., Yamaguchi J., Perata P. and Alpi A. (1995) "Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions", *Plant physiology*, 109: 1669-1676.
110. Gundluch H., Muller M.J., Kutchan T.M. and Zenk M.H. (1992) "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures" *Proc. Nat. Acad. Science. USA*, 98: 2389-2393.
111. Gupta P., Sharma S. and Saxena S. (2015) "Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol" *Appl Biochemistry Biotechnology*; 176(3): 863-74.
112. Halliwell B., Rafter J. and Jenner A. (2005) "Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols: direct or indirect effects? antioxidant or not?" *American Journal. ClinicNut*, 81:268S-276S.
113. Hampton J. C. and Tekrony D. M. (1995) "Hand book of vigor test and method (3 rd Ed.)" *International seed Testng Association (ISTA), Zurich, Switzerland*, 117p.
114. Handel E.V. (1968) "Direct micro determination of sucrose" *Annals of Biochemistry*, 22: 280-283.
115. Hare P.D. (2007) "Metabolic implications of stress-induced accumulation in plant" *Plant Growth Regulation.*, 21: 79-103.
116. Hardegee S. P. (2006) "Predicting germination response to temperature. I. Cardinal temperature models and subpopulation-specific regression" *Annals of Botany*. 97: 1115–1125.
117. Hardegee S.P. and Winstral A.H. (2006) "Predicting Germination Response to Temperature. II. Threedimensional Regression, Statistical Gridding and Iterative-probit Optimization Using Measured and Interpolated-subpopulation Data" *Annals of Botany*, 98: 403–410.
118. Hayat Q., Hayat S., Irfana M. and Ahmad A. (2010) "Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review" *Environmental and Experemental Botany*, 68: 14–25.
119. Hearn L. K. and Subedi P. P. (2009) "Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy" *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2): 165-168
120. Heath R.L. and Packer L. (1968) "Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation" *Archives of Biochemistry. Biophysics*. 12: 198-189.
121. Heredia J.B. and Cisneros-Zevallos L. (2009) "The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on PAL activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities" *Post Biology Tecnology*, 51(2): 242-249.
122. Hilhorst H.W.M. (1998), "The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited" *Seed Science, Reserch*, 8:77–90.
123. Holst N., Asmussen R. and Astiaans B. (2007), "Field weed population dynamics: a review of model approaches and applications" *Weed Reserch*. 47: 1–14.

124. Huang B., Hong Q., Jin L., Zhang Y., Cai P. and Lin Y (2010) "Effects of SNP, PA and SA on cell growth and physiological activities of suspension-cultured protocorn-like bodies of *Dendrobium huoshanense*" *Plant Physiology*. 46: 423-426.
125. Jabbarzadeh Z., Khosh-Khui M. and Salehi H. (2009) "The effect of foliar applied salicylic acid on flowering of African violet" *Australian Journal of Basic and Applied Science*, 3: 4693-4696.
126. Jacobsen, S.E., and Bach, A.P. (1998) "The influence of temperature on seed germination rate in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)" *Seed Science and Technology*. 26:515-523.
127. Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A. and Panneerselvam, R. (2007) "Antioxidant potentials and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus* after treatment with gibberlic acid" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5, 60 (2): 195-200.
128. Jame Y.W. and Cutforth H.W. (2004) "Simulating the effects of temperature and seeding depth on germination and emergence of spring wheat" *Agriculture and Forestry* 55: 78-89.
129. Jana S. and Choudhuri M.A. (1981) "Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging" *Aquatic Botany*., 12: 342-354.
130. Jung S. (2004) "Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems" *Journal of Plant physiology Biochemistry*, 42: 231-255.
131. Kamkar B., Jami Al-Ahmadi M. and Mahdavi-Damghani A. (2011) "Quantification of the cardinal temperatures and thermal time requirement of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) seeds germinate using non-linear regression models" *Industrial Crops and Products*, 35: 192-198.
132. Kang F and Rawsthorne S. (1996) "Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos" *Planta*, 199: 321-327
133. Kar M. and Mishra D. (1976) "Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence" *Plant Physiology*., 57: 315-319.
134. Kicheva M. I., Tsonev T. D. and Popova L. p. (1994) "Stomatal and non stomatal limitation to photosynthesis in two wheat cultivars subjected to water stress" *Journal of Photosynthetic*, 30 (1): 107 – 116.
135. Kim H. J., Feng H., Kushad M. M. and Fan X. T. (2006) "Effects of ultrasound, irradiation, and acidic electrolyzed water on germination of alfalfa and broccoli seeds and *Escherichia coli* O157: H 7", *Journal of Food Science*, 71: 168- 173.

136. King J.E. and Gifford D.J. (1997) "Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth: I. Arginine and Arginase activity", *Plant Physiology*. 113: 1125-1135. 27-40.
137. King, C. (2005) "Commercial Echinacea production, Alberta agriculture" *Food and rural development*, 13, 24, 27, 40.
138. Kinghorn A. D. (1987) "Biologically active compounds from plants with reputed medical and sweetening properties" *Journal of Natural Products* 50: 1009-1024.
139. Kolb N., Herrera J. L., Ferreyra D. J. and Uliana R. F. (2001) "Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49(10): 4538-4541.
140. Kovacik J., Backor M., Strnad M. and Repcak M. (2009) "Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants" *Plant Cell Report* 28: 135-143.
141. Krizek D.T., Britz S.J. and Mirecki R.M. (1998) "Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce" *Physiology Plantarum* 103: 1-7.
142. Kumari G. J., Reddy A.M., Naik S. T., Kumar S.G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P.C. and Sudhakar C. (2006) "Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase enzymes in peanut seedlings" *Biologia Plantarum*, 50: 219-226.
143. Laemmli U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685.
144. Larronde F., Krisa S., Decendit A., Cheze C. and Merillon J.M. (1998) "Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars" *Plant Cell Report*. 17: 946-950.
145. Lassig R., Gutermuth T., Bey T.D., Konrad K.R. and Romeis T. (2014) "Pollen tube NAD(P) Hoxidase sactasaspeed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant Journal*,. 78, 94-106
146. Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L. and Ah-Hen K. (2012) "*Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects" *Food Chemistry* 132: 1121-1132
147. Li L., Li M., Yu L., Zhou Z., Liang X. and Liu,Z. (2014).The FLS2-associated kinase BIK1 direct lyphosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329-338.
148. Lipiec J., Janas P. and Barabasz W. (2004) "Effect of oscillating magnetic field pulses on the survival of selected microorganisms", *International Agrophy*. 18: 325-328.

149. Luo Y. (1991) "Changes of Ci /Ca in association with stomatal a no stomatal limitation to photosynthesis in water stressed *Abutilon theophrasti*" *Journal of Photosynthetic*, 25: 273 – 279.
150. Maciejewska B.D., Kesy J., Zielinska M. and Kopcewicz J.( 2004) "Jasmonates inhibit flowering in short-day plant *parbitis nil* " *Plant Growth Regulation*, 43: 1-8.
- 151 Machikowa T., Kulrattanarak T. and Wonprasaid S. (2013) "Effects of ultrasonic treatment on germination of synthetic sunflower seeds", *International Journal Biological, verterinary. Agricultur. Food Engineering*. 7: 11-18
152. Mandal S. (2010) "Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors" *African Journal of Biotechnology*, 9:8038- 8047
153. Marambe B., Ando T., Kouno K. (1992), "Alpha-amylase and protease activities and water relations in germinating sorghum (*Sorghum bicolor moench*) seeds as affected by animal-waste composts", *Soil Science and Plant Nutrution*, 38 (1): 123-131.
154. Maria J., Jimenez-Quesada M.J., Traverso J. A. and Alché J.D. (2016) "NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues" *Frontiers in plant science*. 1-133.
155. Markwell M.A.K., Hass S.M., Tolbert N.E. and Bieber L.L. (1981) "Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedure", *Methods. Enzymol.* 72: 296-303.
156. Marrs K.A. (1996) "The functions and regulation of glutathione s-transferase in plants" *Plant Physiol, Plant Molecular Biology*. 47:127–58
157. McCready R.M., Guggolz J., Silveira V. and Owens H.S. (1950) "Determination of starch and amylase in vegetables" *Analytical Chemistry*, 22: 1156-1158.
158. McDonald M.B. (1999) "Seed deterioration: Physiology, repair and assessment" *Seed Science, Technology*, 27: 177-237.
159. Meloni D.A., Oliva M. A., Martinez C. and Cambraia j. (2003) "Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress" *Environmental and Exeperemental Botany*, 49:69-/76.
160. Memelink J. (2009) "Regulation of gene expression by jasmonate hormones " *Phytochemistry*, 70(13-14): 1560-1570.
161. Meyer S.E., and Pendleton R.L. (2000) "Genetic regulation of seed dormancy in *Purshia tridentata* (*Rosaceae*)". *Annals Botany*. 85: 521-529.
162. Michel B.F. and Kaufmann M.R. (1973) "The osmotic potential of olyethylene glycol 6000" *Plant Physiology*, 57: 914-916.

163. Mikkelsen M. D., Petersen B. L., Glawischnig E., Jensen A. B., Andreasson E. and Halkier B. A. (2003) "Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways", *Plant Physiology*, 131(1): 298-308.
164. Miller G.L. (1959) "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars" *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
165. Mita S., Murano N., Akaike M. and Nakamura K. (1997) "Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin those are inducible by sugars" *Plant Journal*. 11:841-851.
166. Mittler R. (2004) "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance" *Trends Plant Science.*, 7: 405-410.
167. Moller I.M. and Sweetlove L.J. (2010) "ROS signalling-specificity is required" *Trends Plant Science*; 15(7): 370-74.
168. Mondaca R. L., Galvez A. V., Bravo L.Z and Hen K. A. (2012) "Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical" *Nut func aspects, Food Chemistry*, 132: 1121–1132
169. Moons, A. (2005) "Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs)" *Plant Hormones*; 72: 155-202.
170. Munns R. and Tester M. (2008) "Mechanisms of salinity tolerance" *Plant Biology*. 59:651–81.
171. Murtaza G., Asghari R. and Abdul Majid S. (2010) "Changes in specific activity of ascorbate peroxidase during seed development of pea (*Pisum sativum* L.) treated with salicylic acid" *African Journal of Biotechnology*, 9: 5333-5337.
172. Nakano Y. and Asada K. (1981) "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast" *Plant Cell Physiology.*, 22: 867-880.
173. Nanayakkara N. P. D., Klocke J. A., Compadre C. M., Hussain R. A., Pezzuto J. M. and Kinghorn, A. D. (1987) "Characterization and feeding deterrent effects on the aphid, *Schizaphis graminum*, of some derivatives of the sweet compounds, stevioside and rebaudioside A" *Journal Natural Product*, 50(3): 434-441.
174. Ochoa-Alejo N. and Gomez-Peralta J. E. (1993) "Activity of enzymes involved in capsaicin Biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annum* L.)" *Journal of Plant Physiology* 141: 147-152.
175. Omokolo D., Ndoumou G., Ndzomo T. and Djocgoue P.F. (1996) "Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif", *Annals Botany*. 77: 153-158.
176. Parvaiz A. and Satyawati S. (2008) "Salt stress and phyto-biochemical responses of plants" *Plant Soil Environment*. 54: 89-99.

177. Popova L., Ananieva E., Hristova V., Christov K., Georgieva K., Alexieva V. and Stoinova Z.H. (2003) "Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress *Bulg*" *Journal of Plant Physiology*, 13: 133-152.
178. Popova L., Pancheva T., and Uzunova A. (1997) "Salicylic acid: Properties, biosynthesis and physiological role" *Plant Physiology*, 23: 85-93.
179. Qian Z.G., Zhao Z.J., Xu Y., Qian X. and Zhong J.J. (2004) "Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signal for plant secondary metabolism" *Biotechnology and Bioengineering*, 86 (7): 809-816
180. Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. and Watkins C.B. (1997) "Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizing enzymes" *Plant Physiology*, 115: 137-149.
181. Rebetzke G. S. and Richards R. A. (1999), "Genetic improvement of early vigour in wheat", *Australian Journal of Agricultural Research*, 50: 291-301.
182. Rezaei A, Ghanati F, Dehaghi MA. (2011) Stimulation of taxol production by combined salicylic acid elicitation and sonication in *Taxus baccata* cell culture. In: 2011 International Conference on Life Science and Technology IPCBEE; 2011. p. 193–7.
183. Richman A. S., Gijzen M., Starratt A. N., Yang Z. and Brandle J. E. (1999) "Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: Recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway", *Plant Journal*, 19(4): 411-421.
184. Rodriguez Garcia M.I., Quesada M.J., Traverso J. A. and Alcheil J.D. (2016) "NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production in Plant Reproductive Tissues" *Frontiers in plant science*. 1-133.
185. Roubelakis K.A and Kliewer W.M. (1978), "Enzymes of Krebs–Henseleit in *Vitis vinifera* L.," *Plant Physiology*, 62:344–347
186. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C. and Yamasaki, H. (2002) "Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plants" *Toxicol.* 177: 67-80.
187. Salvemini F., Franze A., Iervolino A., Filosa S., Salzano S and Ursini MV (1999) "Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression", *Journal of Biological Chemistry*, 274: 2750–2757
188. Samfield D. M., Zajicek J. M. and Cobb B. G (1990 a) "Germination of *Coreopsis lanceolata* and *Echinacea purpurea* seeds following priming and storage", *Horticultural Science*, 25: 1605–1606.
189. Samfield D.M., Zajicek J.M. and Cobb B.G. (1991 b) "Rate and uniformity of herbaceous perennial seed germination and emergence as affected by priming", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 10–13.



190. Sangtarash M.H., Qaderi M.M., Chinnappa C.C. and Reid D.M. (2009b) "Carotenoid differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid" *Environmental and Experimental Botany*, 66 (2): 212-219
191. Seefeldt S.S., Kidwell K.K. and Waller J.E. (2002) "Base growth temperature, germination rate and growth response of contemporary spring wheat cultivars from the USA Pacific North West" *Field Crop Research*, 75: 47-52.
192. Seyoum A., Asres K. and El-Fiky F.K. (2006) "Structure radical scavenging activity relationships of flavonoid" *Phytochemistry*, 67(18): 2058-2070.
- 193 Shafii B. and Price W.J. (2001) "Estimation of cardinal temperatures in germination data analysis" *Journal of Agricultural, Biological and Environmental. Statistict*, 6: 356-366.
194. Shimizu Y., Maeda K., Kato M. and Shimomura K. (2010) "Methyl jasmonate induces anthocyanin accumulation in *Gynura bicolor* cultured roots", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 46(5): 460-465.
195. Shin Y. K., Baque M. A., Elghamedi S., Lee E. J. and Paek K. Y. (2011) "Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on in vitro germination and protocorm formation of calanthe hybrids" *Australian Journal Crop Science*, 5: 582- 588.
196. Sleper D., Pathan M. S., Camps-Raga B., Boriraksantikul N., Tantong S., Gyawali S. R., Kirawanich P. and Islam N.E. (2008) "Experimental analysis of corn seed germination enhancement under the application of electromagnetic and magnetic fields" , *Proceeding of the European Electromagnetics (EUROEM 2008), Lausanne, Switzerland*. PW Savostin. Magnetic growth relations in plant. *Planta*; 12, 327-35.
197. Smith-Jochum C.C. and Albrecht M.L. (1987) "Field establishment of three Echinacea species for commercial production" *Acta Horticulturae*, 208: 115-18.
198. Soltani A., Gholipour M. and Zeinali E. (2006) "Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity", *Environmental and Experimental Botany*, 55(1): 195- 200
199. Soltani A., Robertson M.J., Torabi B., Yousefi-Daz M. and Sarparast R. (2006a) "Modeling seedling emergence in chickpea as influenced by temperature and sowing depth" *Agricultural and Forest. Meteorology*, 138, 156-167.
200. Soltani E., Akram-Ghaderi F. and Soltani A. (2008). "Applications of germination modeling on the response to temperature and water potential in seed science research. 1st National Conference of Seed Science and Technology in Iran. Gorgan, Iran. Plenum Press, pp. 445.
201. Suzuki., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A. and Mittler R. (2011). "Respiratory bursts toxi dases: theeng in esof ROS signaling" *Curr. Opin. Plant Biology*, 14, 691-699

202. Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K. and Shinozaki K., Marino D., Dunand C., Puppo A. and Pauly N. (2012) "A burst of plant NADPH oxidases" *Trends Plant Science*, 17, 9–15
203. Tian X. and Li Y. (2007) "Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings" *Biologia Plantarum*, 50: 775-778.
204. Todd C.D. and Gifford D.J. (2002) "The role of the mega gametophyte in maintaining loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedling arginase gene expression in vitro", *Planta*, 215: 110-118.
205. Tuan-hua Ho D and Scandalios JG (1975) Regulation of Alcohol Dehydrogenases in Maize Scutellum during germination", *Plant Physiology*, 56: 56-59.
206. Ueda J. and Saniewski M. (2006) "Methyl Jasmonate- induced stimulation of chlorophyll formation in the basal part of tulip bulbs kept under natural light conditions". *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.*, 14: 199-210.
207. Van Gestelen P., Asard H. and Caubergs R.J. (1997) "Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-O<sub>2</sub> synthase from other NAD (P) H oxidoreductases" *Plant Physiology* 115: 543–550.
208. Vogt T. (2010) "Phenylpropanoid biosynthesis" *Molecular Plant* 3: 2-20.
209. Wakao S., Andre C. and Benning C. (2008) "Functional Analyses of Cytosolic Glucose-6-Phosphate Dehydrogenases and Their Contribution to Seed Oil Accumulation in Arabidopsis <sup>[OAJ]</sup>" *Plant Physiology*, 146: 277–288.
210. Wang K., Jin P., Cao S., Shang H., Yang Z. and Zheng Y. (2009) "Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in Chinese bayberries" *Journal of Agricultural Food Chemistry*: 5809-5850.
211. Wasternack C. and Hause B. (2013) "Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*" *Annals of Botany*. 2013; 111: 1021±1058.
212. Wartidiningsih N., Geneve R.L. and Kester S.T. (1994 b) "Osmotic priming or chilling stratification improves seed germination of purple coneflower" *Horticultural science* 29 (12): 1445-1448
213. Wei H., Tye L., Bresnick E. and Birt D.F. (1990) "Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice" *Cancer Research*, 50: 499-502.
214. Wells R., Meredith W. R. and Williford J. (1980) "Heterosis in upland cotton. II. Relationship of land area to plant photosynthesis", *Crop Science*, 28: 522-525.
215. Wettlaufer S.H. and Leopold A.C. (1991) "Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration", *Plant Physiology*, 97: 165-169.

- 216 Windauer L., Altuna A. and Benech-Arnold R. (2007) “Hydrotime analysis of *Lesquerella fendleri* seed germination responses to priming treatments”, *Industrial Crops. Product*, 25: 70-74.
217. Yan B., Dai Q., Liu X., Huang Sh. and Wang Z. (1996) “ Flooding induce membrane damag, lipid oxidation and activated oxygen generation in Corn leaves ” *Plant and Soil*, 179:261-268.
218. Yaldagard M., Mortazavi S.A. and Tabatabaie F. (2008) “Application of ultrasonic waves as a priming technique for accelerating and enhancing the germination of barley seed: optimization of method by the taguchi approach”, *Journal.Institute of Brewing* 114: 14-21.
219. Yong C., Min G Ye., Chong-shun Z., Xue-kun Z and Zhong H. (2010) “Combining ability and genetic effects of germination traits of (*Brassica napus* L.) Under waterlogging stress conditions ” *Agricultural Science*: 951-957.
220. Zarei-Ghadikolaee M., Abdolzadeh A and Sadeghipour HM. (2010) “Arginase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activities in moist chilled and warm-incubated walnut kernels”, *Trees*, 24: 425–433
221. Zhao J.L., Davis., C. and Verpoorte R. (2005) “Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites” *Biotechnology. Advances*. 23: 283–333.

## جدول پیوست

جدول ۴-۱-۱- پیوست تجزیه واریانس صفات حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، کارایی استفاده از ذخایر بذر، وزن خشک گیاهچه و فعالیت آلفا آمیلاز. قند کل، قندهای احیایی و

غیراحیایی در بذر سرخارگل

میانگین مربعات									
S.O.V	df	Gmax	R50	کارایی استفاده از ذخایر بذر	وزن خشک گیاهچه	آلفا آمیلاز	قند کل	قندهای احیایی	قندهای غیراحیایی
تیمار	۴	۱۹**	۰/۰۰۰۴۲۳**	۰/۰۳۷**	۰/۰۰۰۲**	۰/۱**	۵۸۲۰**	۱۸۷۷۰**	۳**
اشتباه	۱۵	۱/۳۱	۰/۰۰۰۰۰۳۴	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	۲۱۶/۴	۴۱۷	۵/۳

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

جدول ۴-۱-۲- پیوست تجزیه واریانس صفات نسبت قندهای غیراحیایی به احیایی، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، EC، GPX، POX،

CAT، GSR، کلروفیل a و b در بذر سرخارگل

میانگین مربعات										
Chlb	Chla	GSR	CAT	POX	GPX	EC	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NR/R	df	S.O.V
۶/۷**	۹/۳.**	۰/۰۳۵**	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۲**	۶۰۳**	۰/۰۳۳**	۰/۰۱۱**	۴	تیمار
۰/۸۶	۱/۳۱	۰/۰۰۱۴	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۰۱	۱۲۰	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۴	۱۵	اشتباه
۱۳/۲۲	۱۴/۴۲	۵/۸	۱۴/۵	۲۱/۰۲	۱۳/۳	۵/۵	۶	۵/۱۲		cv

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

جدول ۴-۱-۳- پیوست تجزیه واریانس صفات آلفا آمیلاز، پروتئاز، قند کل، آرژیناز، پروتئین محلول و کل

میانگین مربعات							منبع تغییرات
df	آلفا آمیلاز	پروتئاز	قند کل	آرژیناز	پروتئین محلول	پروتئین کل	
۲	۰/۳۲۳**	۱۳/۰۴**	۳۴/۱**	۱۳۸۶/۸**	۱۷۸/۳۵**	۴۵۶۴**	تیمار
۹	۰/۰۰۳	۱/۰۴۵	۴۵/۵	۱۶۶/۵	۵/۳	۵۹۶/۸	اشتباه
	۴/۶	۱۱	۶/۶	۵/۹۵	۴/۸	۱۰/۳	cv

\*\*\*: معنی دار در سطح احتمال ۱%

جدول ۴-۱-۴- تجزیه واریانس صفات R50، Gmax، طول گیاهچه و ریشه‌چه، وزن خشک گیاهچه در بذر سرخارگل

میانگین مربعات						
وزن خشک گیاهچه	طول ریشه‌چه	طول گیاهچه	R50	Gmax	df	sov
۰/۰۰۰۰۲**	۲/۲۱**	۲/۳**	۰/۰۰۰۰۵**	۷۷/۷۴**	۱۲	تیمار
۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰۰۰۱	۲/۲۳	۳۹	اشتباه

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

جدول ۴-۱-۵- پیوست تجزیه واریانس صفات وزن لپه‌های باقیمانده، کارایی استفاده از ذخایر بذر، میزان استفاده از ذخایر و قدرت بذر

میانگین مربعات					
منبع تغییرات	df	کسرذخایر مصرف شده	کارایی استفاده از ذخایر بذر	میزان استفاده از ذخایر بذر	قدرت بذر
تیمار	۱۲	۰/۰۰۷**	۰/۰۷۱**	۰/۰۰۰۴**	۲۰۶۱۹
اشتباه	۳۹	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۱	۲۶۴

\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



جدول ۴-۱-۶- پیوست تجزیه واریانس صفات حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی، قند کل و

پروتئین محلول بذر استویا

میانگین مربعات						
پروتئین	قند کل	GU	Ru	Gmax	Df	S.O.V
۶۷/۱۴ **	۳/۳ **	۹۹۷ **	۱/۲۳ **	۲۳۶ **	۴	پرتودهی
۳/۷۴	۰/۴۵	۲۶/۷	۱/۱	۱/۸	۱۰	اشتباه

\*\*\*، \* و n.s: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و عدم معنی‌داری.

جدول ۴-۳-۱ تجزیه واریانس NADPH اکسیداز، پراکسید هیدروژن و گلبرگ، پراکسیداسیون لیپید،

سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز در سرخارگل

میانگین مربعات						
منبع	df	NADPH اکسیداز	پراکسید هیدروژن	پراکسیداسیون لیپید	سوپراکسیددسموتاز	کاتالاز
تغییرات						
بلوک	۲	۰/۰۰۰۰۳ n.s	۰/۰۰۰۰۴ n.s	۰/۰۰۰۰۴ n.s	۰/۰۰۶۹ n.s	۰/۰۰۰۰۰۰۲ n.s
محلول - پاشی	۱۱	۰/۰۰۰۰۹۵ **	۰/۴ **	۰/۰۰۷ **	۲/۳۵ **	۰/۰۰۰۰۳ **
خطا	۲۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۵۶	۰/۰۰۰۰۰۱

\*\*،\* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۴-۳-۱-۲- تجزیه واریانس گایاکول پراکسیداز برگ و گلبرگ، پلی فنل اکسیداز برگ و گلبرگ، آسکوربات پراکسیداز، G-S-T، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در سرخارگل

میانگین مربعات								df	SOV
گلوتاتیون ردوکتاز	گلوتاتیون پراکسیداز	G-S-T	آسکوربات پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز گلبرگ	پلی فنل اکسیداز برگ	گایاکول پراکسیداز گلبرگ	گایاکول پراکسیداز برگ		
۰/۰۰۰۰۰۳ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰۰۰۲ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰۰۱۲ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰۰۰۵ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۱۷ <sup>n.s</sup>	۰/۱۴ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰۰۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰۰۱ <sup>n.s</sup>	۲	بلوک
۰/۰۰۰۰۵ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۰۳۶ <sup>**</sup>	۰/۰۰۵ <sup>**</sup>	۰/۷۸ <sup>**</sup>	۳/۳۲ <sup>**</sup>	۰/۰۲ <sup>**</sup>	۰/۰۲۳ <sup>**</sup>	۱۱	تیمارها
۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۳۵	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۵	۲۲	خطا

\*\*\*، \* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۳-۱-۳-۴ تجزیه واریانس PAL، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین برگ و گلبرگ، اسید آسکوربیک گلبرگ و پروتئین برگ

میانگین مربعات								df	منبع تغییرات
پروتئین برگ	اسید آسکوربیک	آنتوسیانین گلبرگ	آنتوسیانین برگ	فلاونوئید	فنل	PAL	گلبرگ		
۲/۳۷ <sup>n.s</sup>	۰/۱۲ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۳ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰۰۰۴ <sup>n.s</sup>	۰/۰۲ <sup>n.s</sup>	۰/۳۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۵ <sup>n.s</sup>	۲	بلوک	
۳۹۷ <sup>**</sup>	۴۷/۳۵ <sup>**</sup>	۰/۰۶ <sup>**</sup>	۰/۰۰۱ <sup>**</sup>	۱/۲۲ <sup>**</sup>	۵۶۷ <sup>**</sup>	۲/۸ <sup>**</sup>	۱۱	تیمارها	
۴/۱۳	۰/۰۷۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۲۱	۲۴/۱	۰/۰۶	۲۲	خطا	

\*\*\*، \* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۴-۳-۱-۴- تجزیه واریانس پروتئین برگ، chl a, b، کلروفیل کل، قند کل، قندهای احیایی و غیراحیایی و

نشاسته در سرخارگل

میانگین مربعات										
منبع تغییرات	df	پروتئین	chl a	chl b	کارتنوئید کل	کلروفیل کل	قند کل	قندهای غیراحیایی	قندهای احیایی	نشاسته
بلوک	۲	۶/۷ <sup>n.s</sup>	۰/۰۲ <sup>n.s</sup>	۰/۰۶ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱ <sup>n.s</sup>	۰/۱۹ <sup>n.s</sup>	۱/۶۸ <sup>n.s</sup>	۰/۹ <sup>n.s</sup>	۲/۱۱ <sup>n.s</sup>	۲۵/۵ <sup>n.s</sup>
تیمارها	۱۱	۱۸/۵ <sup>**</sup>	۰/۷ <sup>**</sup>	۰/۶۸ <sup>**</sup>	۱/۷ <sup>**</sup>	۲/۷ <sup>**</sup>	۹۳/۱ <sup>**</sup>	۵۱/۲ <sup>**</sup>	۳۱۱ <sup>**</sup>	۱۵۷۶ <sup>**</sup>
خطا	۲۲	۵/۲	۰/۰۴۳	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۷۳	۲/۲	۱/۶۴	۸/۸۴	۱۳

\*\*\*، \* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۴-۳-۱-۵- تجزیه واریانس محتوی نسبی آب برگ و هدایت روزنه‌ای برگ در سرخارگل

میانگین مربعات			
منبع تغییرات	df	محتوای نسبی آب برگ	هدایت روزنه‌ای
بلوک	۲	۱۰/۳۶ **	۲۳/۱ n.s
محلول پاشی	۱۱	۱۴۲/۲ **	۶۱۱۱ **
خطا	۲۲	۳/۲۰	۴۳/۲۷

\*\*\*، \* و n.s معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی‌داری می‌باشد.

جدول ۴-۳-۱-۶- تجزیه واریانس ارتفاع، شاخه فرعی، وزن خشک برگ، ریشه، ساقه، گل، تعداد غنچه و گل در سرخارگل.

میانگین مربعات								df	منبع تغییرات
وزن خشک گل	تعداد گل	تعداد غنچه	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه	وزن خشک برگ	شاخه‌ی فرعی	ارتفاع		
۰/۰۰۵	۰/۵۳ <sup>n.s</sup>	۸/۵۹ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۲۰	۶/۰۸ <sup>**</sup>	۰/۰۵ <sup>n.s</sup>	۴/۳ <sup>n.s</sup>	۳/۷ <sup>n.s</sup>	۲	بلوک
۰/۱۷ <sup>**</sup>	۴۳۱/۴ <sup>*</sup>	۴۲۹ <sup>**</sup>	۰/۲۱ <sup>**</sup>	۱۷۶۵۷ <sup>**</sup>	۰/۳۳ <sup>**</sup>	۳۷/۷ <sup>**</sup>	۶۳/۲ <sup>**</sup>	۱۱	تیمارها
۰/۰۱۳	۴/۳	۸/۵	۰/۰۱	۲۲۰	۰/۰۱۴	۲/۲۳	۲/۹۶	۲۲	خطا

\*\*\*، \* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۴-۳-۲-۱- تجزیه واریانس پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، EC، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی-فنل اکسیداز (POX)، گلوکاتایون S- ترانسفراز (G-S-T) و فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در استویا.

میانگین مربعات							Df	منبع تغییرات
PAL	GS-T	POX	GPX	EC	$H_2O_2$			
۷۷۳۹ n.s	۰/۰۰۰۰۳ n.s	۰/۰۰۰۰۴ n.s	۰/۰۰۰۰۳ n.s	۱۲/۴۶ n.s	۰/۰۰۹ n.s	۲	بلوک	
۸۷۰۸۴/۵ **	۰/۰۰۴ **	۰/۰۰۸ **	۰/۰۰۳ **	۶۳۵/۸۶ **	۲/۸۲ **	۱۱	تیمارها	
۲۵۱۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰۱	۶/۴۵	۰/۰۰۴	۲۲	خطا	

n.s و \*، \*\* معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.



جدول ۴-۳-۲- تجزیه واریانس فنل کل، فلاونوئید، پروتئین محلول، کلروفیل a و b و کارتنوئید.

میانگین مربعات							
منبع تغییرات	df	فنل	فلاونوئید	پروتئین	chla	Chl b	کارتنوئید
بلوک	۲	۷۲/۱۷ n.s	۱۶/۲۲ n.s	۲/۸ n.s	۰/۰۱ n.s	۰/۰۰۰۵ n.s	۰/۰۰۲ n.s
تیمارها	۱۱	۳۵۰۵/۷**	۱۴۴۸**	۴۱۹/۱۱**	۰/۵۸**	۰/۱۸۵**	۰/۵۷**
خطا	۲۲	۱۵۴/۴	۱۳/۱	۹/۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۴۴	۰/۰۰۲

\*\*\*، \* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۴-۳-۳-۳- تجزیه واریانس کلروفیل کل، قند کل، ارتفاع، شاخه فرعی، وزن خشک ساقه و برگ در استویا.

منبع	df	قند کل	ارتفاع	شاخه فرعی	وزن خشک ساقه	وزن خشک برگ
تغییرات						
بلوک	۲	۳۷۳/۶ <sup>n.s</sup>	۰/۱۱ <sup>n.s</sup>	۴/۳۳ <sup>*</sup>	۰/۰۰۰۶ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۲ <sup>n.s</sup>
تیمارها	۱۱	۱۲۴۸۰۶ <sup>**</sup>	۵۵/۲ <sup>**</sup>	۳۷/۶۶ <sup>**</sup>	۰/۰۱۲ <sup>**</sup>	۰/۰۲۸ <sup>**</sup>
خطا	۲۲	۱۳۲۱	۶/۲۶	۲/۲۳	۰/۰۰۱	۰/۰۸۸

\*\*\*، \* و n.s معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد، عدم معنی داری می باشد.

جدول ۵- همبستگی صفات فیزیولوژیکی سرخارگل

	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۱-فلانول									۱	
۲- فنول								۱	۰/۰۲۷ n.s	
۳- G-S-T							۱	۰/۵۴ **	۰/۱۷ n.s	
۴- GPX						۱	-۰/۰۸ n.s	۰/۰۱۶ n.s	۰/۱۲ n.s	
۵- SOD					۱	۰/۰۶ n.s	-۰/۲۷ n.s	۰/۲۲ n.s	۰/۲۹ n.s	
۶- پروتئین				۱	-۰/۳۱ *	-۰/۵۲ **	-۰/۳۱ *	-۰/۶۱ **	n.s -۰/۲۳	
۷- آنتوسیانین			۱		۰/۰۴ n.s	۰/۱۳ n.s	-۰/۴۳ **	-۰/۰۳۲ n.s	-۰/۰۱ n.s	
۸- NADPH		۱			۰/۴۹ **	۰/۲۳ n.s	-۰/۲۴ n.s	۰/۵۱ **	۰/۴۶ **	
اکسیداز										
۹- PAL	۱	۰/۵۸ **	-۰/۴۳ **	-۰/۵۲	۰/۲۲ n.s	۰/۱۲ n.s	۰/۴۹ **	۵۷ ** ۰/	۰/۳۲ *	

\*\*، \* و n.s به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی داری

جدول ۶- همبستگی صفات فیزیولوژیکی با وزن خشک برگ و ساقه استویا

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱	۱۴
chl b-۱														
-۲		۱												
کارتنویید														
۳-کلروفیل			۱											
کل														
۴-فلانوول				۱										
-۵					۱									
آنتوسیانین														
۷- فنول						۱								
۸- فلانوویید							۱							
۹- پراکسید								۱						
هیدروژن														
G-S- ۱۰									۱					
T														
PAL-۱۱										۱				

	۱	۰/۰۲۹*	۰/۳*	۰/۱ n.s	۰/۰۹ n.s	۰/۰۳ n.s	۰/۳۱*	۰/۰۷ n.s	۰/۳۴*	۰/۲۸ n.s	۰/۳۴*	۱۲-قند	
												کل	
	۱	۰/۰۸	۰/۶۵**	۲	۰/۴۵**	۰/۶۶**	۰/۸۶**	۰/۸۵**	۰/۶۸**	۰/۶۸**	۰/۸۵**	۰/۶۸**	۱۳-وزن
		n.s	**./										خشک برگ
	۱	۰/۹۹	۰/۰۸	۰/۶۵**	۰/۱۸	۰/۴۵**	۰/۶۶**	۰/۸۶**	۰/۸۵**	۰/۶۸**	۰/۶۸**	۰/۸۵**	۱۴-وزن
		**	n.s		n.s								خشک
													ساقه

\*\*\*، \* و n.s به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی داری.

## Abstract

Pre-treatment of seeds with ultrasonic wave is one of biophysical seed priming. Continuous ultrasonic wave's impact increases the penetrability of the seed shell and accelerates the absorption of water and increases the temperature of the tissues. The increase in temperature and rate of seed turgescence in pretreated seeds accompany with accelerated changes in seed germination metabolism. So, the aim of this study was to investigate the effect of ultrasonic waves on germination, and activity of some germination-related enzymes in purple coneflower seeds. This experiment was carried out in a completely randomized design with 5 treatments and 4 replications in Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology in 2017. Experiment treatments were 5 irradiation durations of 0, 10, 15, 20, and 25 minutes with ultrasonic device. The results of this experiment showed that the effect of irradiation durations was significant on all measured traits. The highest percentage of germination and seedling dry weight was obtained for 15 minutes ultrasonication. The highest amount of  $R_{50}$  and seed reserve utilization efficiency was obtained for 15 and 25 minutes ultra-sonication. Ultrasound waves caused increase alpha-amylase, protease, alcohol dehydrogenase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, glutathione reeducates activities, sugars and proteins content in most of irradiation durations compared to control. The best irradiation duration that improved germination properties and biochemical characteristic of germinating purple coneflower seed was 15 minutes.

In order to quantify the germination-rate response of purple coneflower to temperature and water potential, the germination response of purple coneflower was investigated under temperature treatments (10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C) and water potential (0, -3, -6, and -9 bar) as factorial based on completely randomized design. Results showed that the effect of temperatures, water potentials and their interactions were significant on germination rate and germination percent. Assessing three non-linear regression models including dent like, 2-piece segmented, and original beta indicated the superiority of 2-piece segmented model. The resulted cardinal temperature were the base temperature of 17.02 °C, the optimum temperature of 23.8 °C and ceiling temperature of 43.3 °C, and the biologic hours for germination for potential of zero bar was 84.5 hours.

Salicylic acid and jasmonic acid (chemical elicitor) are drawing attention since they as key signaling compounds in induction process lead to the accumulation of secondary metabolites. Exogenous application of these compounds causes an induction of pseudo stress in plant and excites defensive responses of plant. In response to induction of oxidative stress, the plant increases the amount of antioxidant genes expression followed by an enhancement in activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants (they often have a medicinal aspect). The present study was carried out to investigate the effect of salicylic acid and jasmonic acid on enzymes stimulating oxidative stress, defensive enzymes and some secondary metabolite, yield and yield component of purple coneflower and stevia. This experiment arranged as randomized complete block design with three replications and 12 treatments in Agriculture Faculty of Shahrood University of Technology in 2015-2016. Treatments were spraying the jasmonic acid (ja) with 4 concentrations (0, 5, 20 and 50 micromolar), the salicylic acid (sa) with 3 concentrations (0, 0.5 and 1 milimolar) and spraying both of them three times with 10-day intervals, started at reproductive initiation stage (purple coneflower) and after establishment stage (stevia). The analysis of variance results showed that spraying was effective on all total traits with 99% confidence. The highest amount of NADPH oxidase activity obtained for treatment

20ja-1 sa. The activity of enzymatic antioxidants, including SOD, was increased for most treatments. The non-enzymatic antioxidant contents such as total phenol, flavonoid, flavanol and anthocyanin increased for most of treatments. These compounds which are phenyl propanoide compounds got increased along with enhanced activity phenylalanine ammonia lyase. The highest amount of phenol was observed for treatment 50 ja with average of 38.8 mg/g.fw.

Spraying on stevia caused the decrease in amount of chlorophyll a and b in most treatments compared to control, but carotenoid content was higher in 9 treatments than control. The enzymatic antioxidant activities increased for some treatments. The content of non-enzymatic antioxidants got increased, the phenol content was higher for most treatments, flavanol and flavonoid contents increased for all treatments. Despite decreasing the amount of chlorophyll content, probably due to increased antioxidant activity, the highest dry leaf weight was obtained for treatments 20ja-0.5 sa, 20 ja-1sa, 50ja- 0.5 sa and 50ja-1sa. The amount of Stevioside and Rebaudioside A was measured for 3 treatments. The highest amount of Rebaudioside A was obtained for treatment 20 ja. The jasmonic acid could make a change in glycosides amounts, and enhance the amount of Rebaudioside A which is the best compound in stevia. Therefore, the application of jasmonic acid is suggested to increase the Rebaudioside A.

**Key words: jasmonic acid, purple coneflower, salicylic acid, stevia, ultrasonic wave**



**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Agriculture**

**Ph.D Thesis in Agronomy**

**Effect of ultrasound, Jasmonic acid and salicylic acid on growth and  
some qualitative characteristics of *Stevia rebaudiana Bertonii* and  
*Echinacea purpura***

**By: Fatemeh Rasouli**

**Supervisor:**

**Dr. Manoochehr Gholipoor**

**Advisors:**

**Dr. Kambiz Jahanbin**

**Dr. Hamid Reza Asghary**

**September, 2018**