

اثرات آللوپاتیک عصاره آبی برگ گردو (*Juglans regia*) بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) تحت همزیستی با قارچ میکوریز *Glomus versiforme*

شکیبا عزیزبگی^۱ و جلیل خارا^{۲*}

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۳۰)

چکیده:

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گردو بر روی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه جعفری تلقیح شده با قارچ میکوریز *Glomus versiforme* و گیاهان غیرمیکوریزی در شرایط گلخانه‌ای مطالعه شد. در این مطالعه ۳ غلظت متفاوت از عصاره آبی برگ گردو (عصاره کامل، نیم و یک چهارم غلظت عصاره کامل) استفاده شد. نتایج بدست آمده در گیاهان ۴۵ روزه نشان داد که افزایش غلظت عصاره آبی برگ گردو باعث کاهش میزان کلروفیل a و b و افزایش محتوای کاروتنوئید می‌شود که این افزایش در گیاهان میکوریزی بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. محتوای پروتئین کل در اندام هوایی گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی در غلظت یک چهارم، افزایش و سپس در غلظت‌های بیشتر کاهش یافت. با افزایش غلظت عصاره آبی برگ گردو محتوای پرولین و اسیدهای آمینه آزاد در گیاهان افزایش یافت که این افزایش در گیاهان غیرمیکوریزی بیشتر از گیاهان میکوریزی بود. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی نیز افزایش یافت؛ اما افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان میکوریزی بالاتر بود. به طور کلی، نتایج نشان داد که با تلقیح قارچ میکوریز با ریشه گیاه جعفری می‌توان تا حدودی اثرات نامطلوب عصاره آللوپاتیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاهان را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: آللوپاتی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پروتئین کل، جعفری، گردو، میکوریز.

مقدمه:

وی همچنین آللوپاتی را به تأثیر متقابل بیوشیمیایی بین گونه‌های مختلف گیاهی و میکروارگانیسم‌ها نسبت داده است (Duke, 1987). غدیری (۱۳۷۲) وجود پتانسیل آللوپاتیک را هم در گیاهان در حال رشد و هم در بقایای گیاهی پوسیده گزارش کرده است. در زمینه آللوپاتی، زیست‌سنجی‌های متفاوتی وجود دارد. بیشترین آن در خصوص تغییر در سرعت و یا درصد جوانه‌زنی و پس از

آلوپاتی (دگرآسیبی) به هر گونه اثر مستقیم یا غیر مستقیم تحریک کنندگی یا بازدارندگی گفته می‌شود که توسط یک گیاه بر گیاه دیگر از طریق تولید ترکیبات شیمیایی و آزاد شدن آنها به درون محیط صورت می‌گیرد (Narwal and Tauro, 1996). واژه آللوپاتی اولین بار توسط دانشمند آلمانی، مولیچ در سال ۱۹۳۷ مطرح شد.

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: jakhara@yahoo.com

آن در ارتباط با تغییر میزان رشد گیاهچه‌ها ناشی از توان آللوپاتیک گیاهان گزارش شده است (مسعودی خراسانی و همکاران، ۱۳۸۴). تاثیر مواد شیمیایی آللوپاتیک بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیک گیاهی شامل تقسیم سلولی، جوانه‌زنی دانه‌گرده، جذب مواد غذایی، فتوسنتز، تنفس، نفوذپذیری غشا، نمو ریشه، فعالیت آنزیم‌ها و همچنین بر برخی ویژگی‌های اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی همچون تاثیر بر توالی گیاهی، ساختار جامعه گیاهی، غالبیت، گوناگونی، تثبیت نیتروژن، مشکلات کشت مجدد و تولید گیاهی به اثبات رسیده است (عباس‌دخت و چائی‌چی، ۱۳۸۲). اندام‌های مختلف گیاهی شامل برگ‌ها، ساقه، پوست درخت، پوست میوه، ریشه‌ها و بخش‌های مختلف بدست آمده از آنها، می‌توانند اثرات آللوپاتیک داشته باشند (Malik, 2005). وقتی بعضی از گیاهان نزدیک یا زیر سایه درخت گردو کاشته می‌شوند زرد و پژمرده شده و می‌میرند. این امر به دلیل تولید ماده شیمیایی کم‌رنگ و غیرسمی است که هیدروژوگلان نامیده می‌شود. هیدروژوگلان در برگ‌ها، ساقه، پوست میوه، درون پوست درخت و ریشه‌ها یافت می‌شود و وقتی در معرض هوا یا خاک قرار می‌گیرد، به ماده آللوپاتیک ژوگلان (۵-هیدروکسی-۴۱-نفتاکوئینون) که بسیار سمی است اکسیده می‌شود (Rietveld, 1983). ریزش برگ‌ها در پاییز یا شسته شدن ژوگلان با آب باران باعث می‌شود گیاهان نزدیک به سایه‌انداز درخت گردو آسیب ببینند. گرچه ژوگلان حلالیت کمی در آب دارد، مقادیر کم آن نیز می‌تواند به گیاهان حساس صدمه بزند. در آزمایشی نشان داده شده که ژوگلان بازدارنده تنفس است و گیاهان حساس را از انرژی لازم برای فعالیت متابولیک محروم می‌کند (Daglish, 1950). گیاهان متحمل به ژوگلان عبارتند از: چغندر، لوبیا، ذرت، پیاز، هویج، کدو، گیلان، بنفشه، یاس، اقاقیا، صنوبر، بلوط و گل‌ابی. از سوی دیگر، حساسیت بعضی از گونه‌ها مثل گوجه‌فرنگی، سیب، سیب‌زمینی، فلفل، بادمجان، کلم، توتون، اطلسی و داودی گزارش شده است (Kocacaliskan and Terzi, 2001).

مکانیسم بالقوه‌ای که یک عامل بیگانه از آن در جهت ایجاد وضعیت مطلوب برای خود و وضعیت نامطلوب برای گیاهان بومی جامعه استفاده می‌کند، تولید مواد شیمیایی گیاهی است که همزیستی بین گیاهان بومی و قارچ‌های میکوریز پرسود را قطع می‌کند (Allen, 1980). گزارش‌ها نشان می‌دهند که اکثر گونه‌های بیگانه کمترین وابستگی را به قارچ‌های میکوریز دارند (Pendelton and Smith, 1983). به نظر می‌رسد که این گونه‌های غیرمیکوریزی می‌توانند باعث کاهش فراوانی قارچ‌های میکوریزی، تسهیل تهاجم گونه‌های بیگانه و پیشگیری از استقرار دوباره جامعه بومی شوند (Reeves et al., 1990). یک مطالعه دیگر نشان داده که انتشار میکوریز می‌تواند ساختار سیستم ریشه‌ای گیاهان رقیب و توانایی آنها برای تولید آللوکمیکال‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (Koid and Li, 1991). امیدپناه و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعات خود در خصوص بررسی پتانسیل آللوپاتیک گیاه مورخوش بر کلزا دریافتند که با افزایش غلظت اسانس حاوی آللوپات، محتوای کلروفیل در برگ کلزا کاهش و میزان کاروتنوئید افزایش می‌یابد. نتایج تحقیقات Abu-Romman و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده است که آللوکمیکال‌ها (ترکیبات شیمیایی مسئول دگرآسیبی) باعث کاهش چشمگیری در محتوای کلروفیل کل و همچنین محتوای پروتئین کل در گندم می‌شوند. نتایج مطالعات متعددی افزایش محتوای پرولین و آمینو اسیدهای آزاد را تحت تاثیر عصاره آللوپاتیک گیاهان مختلف را نشان می‌دهد. مثلاً افزایش محتوای پرولین در برگ گیاه کلزا تحت تاثیر عصاره آبی خردل وحشی که دارای خاصیت آللوپاتی است، گواهی بر این مدعاست (Haddadchi and Masoodi Khorasani, 2006). هم چنین تاثیر عصاره آبی برگ‌های گیاه آفتابگردان بر گیاه گندم در طی ۲۰ روز و تحت شرایط آزمایشگاهی افزایش محتوای DNA، آمینو اسیدهای آزاد، پرولین و محتوای پروتئین کل را نشان می‌دهد (Kamal and Bano, 2009). نتایج برخی تحقیقات نشان داده که عصاره آبی برگ‌های اکالیپتوس باعث افزایش میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در

این محلول غذایی برای ترغیب همزیستی طراحی شده و مقدار فسفر آن نصف مقدار سایر محلولهای غذایی است (Aliasgharzad et al., 2009). محلول غذایی ۳ روز در هفته و به میزان ۱۰۰ میلی لیتر به هر گلدان داده شد. گیاهان ذرت پس از ۱۰ هفته برداشت شدند. مایه تلقیح شامل قطعات ریز ریشه ذرت همزیست حاوی ریشه‌ها، وزیکول‌ها و آربوسکول‌ها، اسپوره‌های قارچ و قطعات ریز ماسه چسبیده به آنها بود.

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی، با ۳ سطح غلظت عصاره آبی برگ گردو (غلظت کامل، یک دوم و یک چهارم غلظت کامل) در ۳ تکرار انجام شد. بذره‌های جعفری با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شد. درون هر گلدان مخلوط خاک و ماسه شسته و استریل شده با نسبت ۵:۱ ریخته شد. حدود ۳۰۰ گرم مایه تلقیح به هر گلدان اضافه گردید. برای آماده سازی تیمارهای غیرمیکوریزی، از مایه تلقیح سترون استفاده شد. سپس در هر گلدان ۲۰ عدد بذر جعفری کاشته شد. گلدان‌ها به اتاقک‌های رشد با دمای شبانه‌روزی ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۷۰ درصد و طول دوره روشنائی ۱۴ ساعت انتقال داده شدند. طول دوره رشد ۴۵ روز در نظر گرفته شد که طی این مدت گلدان‌ها با محلول غذایی نیم قدرت هوگلند به صورت یک روز در میان تغذیه شدند. عصاره آبی برگ گردو نیز به همراه محلول غذایی به نسبت ۱:۲۰ به گلدان‌ها اضافه شد. پس از پایان این مدت، اندام هوایی و ریشه گیاهان از هم جدا و بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک روی آنها انجام شد.

برای اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها از روش Arnon (۱۹۴۹) استفاده شد. ۰/۰۵ گرم از بافت تر برگ‌ها توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ له گردید، با تنظیم صاف شد و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه گذاشته شد. سپس برای تعیین میزان کلروفیل a و b، جذب آن توسط دستگاه

علف هرز فالاریس می‌شود (Niakan and Saberi, 2009). همچنین، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ رقم طلایه کلزا در حضور اسانس برگ گیاه دارویی مورخوش که دارای پتانسیل آللوپاتیک می‌باشد، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد پیدا می‌کند (امیدپناه و همکاران، ۲۰۱۰). هدف از این تحقیق ارزیابی تاثیر آللوپاتیک عصاره آبی برگ گردو بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان جعفری تحت همزیستی قارچ میکوریز *Glomus versiforme* می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

جهت تهیه عصاره آبی برگ گردو، برگ‌های گردو در تابستان سال ۱۳۹۱ در باغ‌های حومه شهرستان ارومیه جمع‌آوری شده و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و توسط آسیاب برقی پودر شدند. سپس ۱۰ گرم پودر خشک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. عصاره حاصل از پارچه نظیف کتانی چهار لایه عبور داده شده و مایع صاف شده به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از جداسازی، از دو فاز ایجاد شده در مایع فوقانی به عنوان عصاره ۱ واحد استفاده گردید (Narwal and Tauro, 1996). به منظور تهیه مایه تلقیح، به یک گلدان حدود ۲۰۰ گرم مایه تلقیح اولیه قارچ *Glomus versiforme* شامل قطعات ریز ریشه‌های همزیست و اسپوره‌های قارچی اضافه گردید و از گیاه ذرت رقم ۷۰۳ به عنوان گیاه میزبان استفاده شد. این مایه تلقیح از گروه خاکشناسی دانشگاه تبریز تهیه شده بود. بذره‌های ذرت پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، با آب مقطر شسته شدند. شرایط محیطی اتاقک کشت به صورت ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی و دمای شب و روز به ترتیب ۲۰ و ۳۲ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. تمام گلدان‌ها پس از هفته سوم با استفاده از محلول غذایی Rorison تغذیه شدند.

اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر و برای تعیین کاروتنوئید کل جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای محاسبه مقادیر کلروفیل a و b و همچنین کاروتنوئید کل از فرمول Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۵) استفاده گردید.

$$\begin{aligned} \text{Chl}_a &= 12/25 A_{663} - 2/79 A_{646} \\ \text{Chl}_b &= 21/5 A_{646} - 5/1 A_{663} \\ C_{x+c} &= (1000 A_{470} - 1/82 \text{Chl}_a - 85/02 \text{Chl}_b) / 198 \end{aligned}$$

برای تعیین پروتئین کل از روش فولن لوری استفاده شد (Lowry *et al.*, 1951). این آزمایش بر اساس هیدرولیز پروتئین‌ها و آزاد شدن اسیدهای آمینه موجود در ساختمان پروتئین‌هاست که با معرف فولن، کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند. در نهایت، شدت رنگ به وسیله اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ۰/۵ گرم بافت تر برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد ساییده شد. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده، ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اضافه شد و مخلوط حاصل پس از قرار گرفتن در بن ماری جوشان و ظهور رنگ آجری در داخل آب یخ قرار داده شد و ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه گردید. میزان جذب فاز رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری محتوای آمینو اسیدهای آزاد از روش Xiong و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. ۰/۵ گرم از بافت تر برگ‌ها با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰ درصد ساییده شده و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از صاف نمودن هموژنات با کاغذ صافی، برای تعیین اسیدهای آمینه آزاد به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده ۱ میلی‌لیتر بافر استیک اسید-استات سدیم، ۳ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۰/۱ میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۳ درصد اضافه شد. محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه بن ماری قرار گرفت. پس از سرد شدن، حجم محلول فوق با اتانول ۶۰ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده

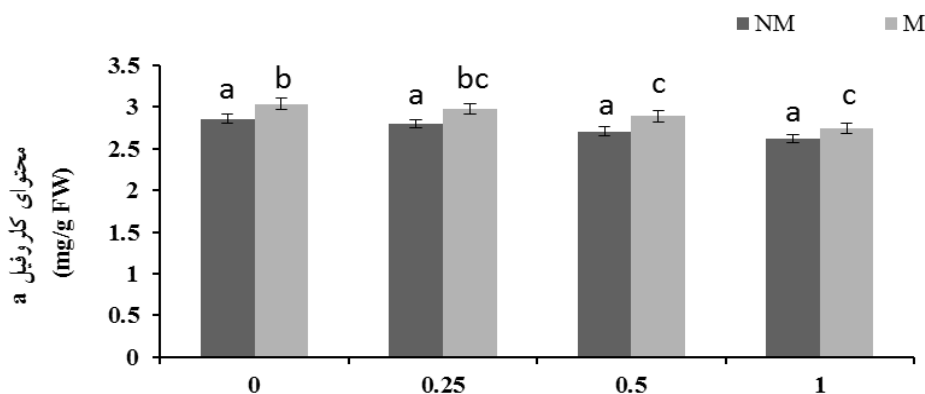
شد و سپس جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت عصاره گیاهی با استفاده از روش Kang و Saltveit (۲۰۰۲) تهیه گردید. ۰/۵ گرم از بافت تر برگ‌ها به داخل هاون سرد منتقل شد. سپس توسط ۳ میلی‌لیتر بافر شامل (بافر تریس-HCl ۰/۵ مولار با pH ۷/۵، ۳ میلی‌مولی MgCl_2 ، ۱ میلی‌مولی EDTA) با دسته هاون ساییده شد. بافر استخراجی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) شامل ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربات نیز بود. هموژنات سپس به مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. محلول رویی به عنوان عصاره خام جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت استفاده گردید. فعالیت آنزیم APX با استفاده از روش Asada (۱۹۹۲) اندازه‌گیری شد. روی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ (شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربات سدیم ۰/۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱٪) ۰/۱ میلی‌لیتر آنزیم استخراجی اضافه شد سپس فعالیت آنزیم از طریق اکسید شدن آسکوربات توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تعیین فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX) با استفاده از روش Sankhla و Upadhyaya (۱۹۸۵) انجام گرفت. روی ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱٪، ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۱٪ و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره‌ی آنزیم استخراجی افزوده شده و فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS Version 18 و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

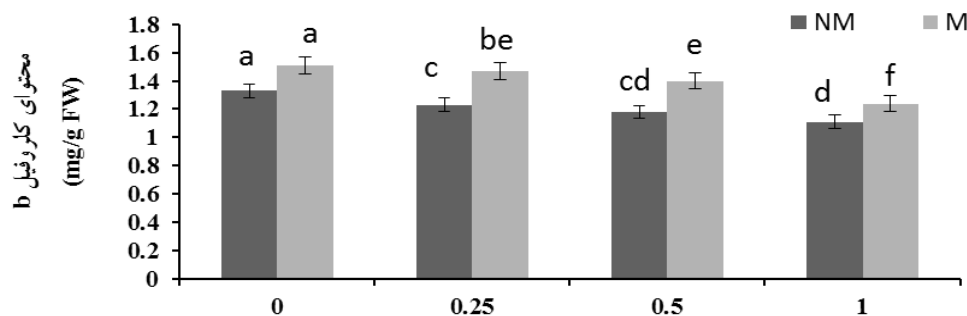
نتایج:

رنگیزه‌های فتوسنتزی: با افزایش غلظت ماده آلوپات عصاره، محتوای کلروفیل a و b هم در گیاهان غیرمیکوریزی و هم در گیاهان تلقیح شده با قارچ



غلظت نسبی ماده آللوپات

شکل ۱- تغییرات محتوای کلروفیل a در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).



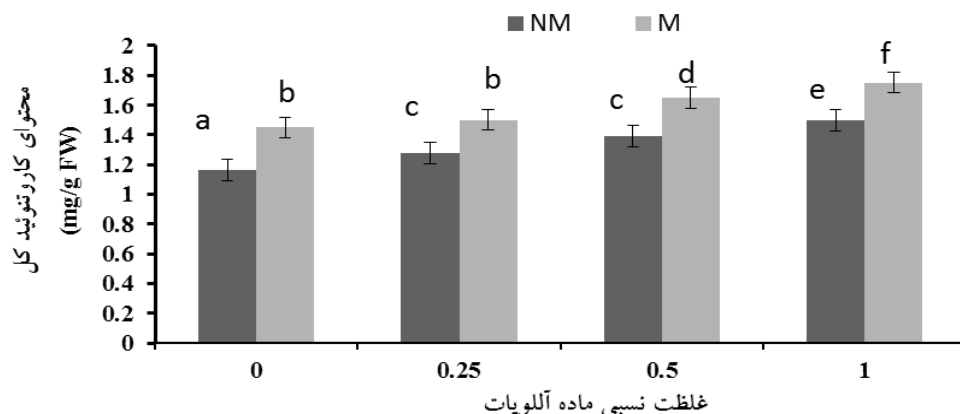
غلظت نسبی ماده آللوپات

شکل ۲- تغییرات محتوای کلروفیل b در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

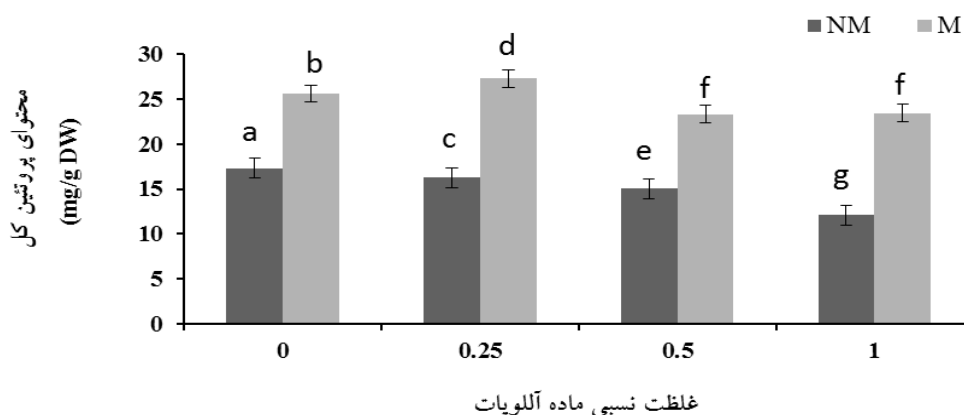
گیاهان همزیست با قارچ *G. versifolia*، در غلظت یک چهارم واحد افزایش و سپس در غلظت‌های نیم و یک واحد کاهش می‌یابد. اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز از محتوای پروتئین بیشتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار بودند (شکل ۴). محتوای پرولین و آمینواسیدهای آزاد در گیاهان تلقیح شده و گیاهان غیرمیکوریزی افزایش یافت. گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز، پرولین و آمینواسیدهای آزاد کمتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی داشتند (شکل‌های ۵ و ۶).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به عنوان آنزیم‌های آنتی اکسیدان دخیل در ایجاد مقاومت در قبال

G. versifolia کاهش یافت. اما این کاهش برای گیاهان غیر میکوریزی معنی‌دار نبود. حضور قارچ موجب کاهش اثرات منفی عصاره بر میزان کلروفیل a و b گیاه جعفری گردید به طوری که در تمام غلظت‌های عصاره برگ گردو محتوای کلروفیل a و b گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۲ و ۱). با افزایش عصاره، محتوای کاروتنوئید کل در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی افزایش یافت همچنین بین گیاهان شاهد و گیاهان همزیست با قارچ *G. versifolia* اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۳). پروتئین کل، پرولین و آمینواسیدهای آزاد: با افزایش غلظت ماده آللوپات، محتوای پروتئین کل اندام هوایی، در



شکل ۳- تغییرات محتوای کاروتنوئید کل در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).



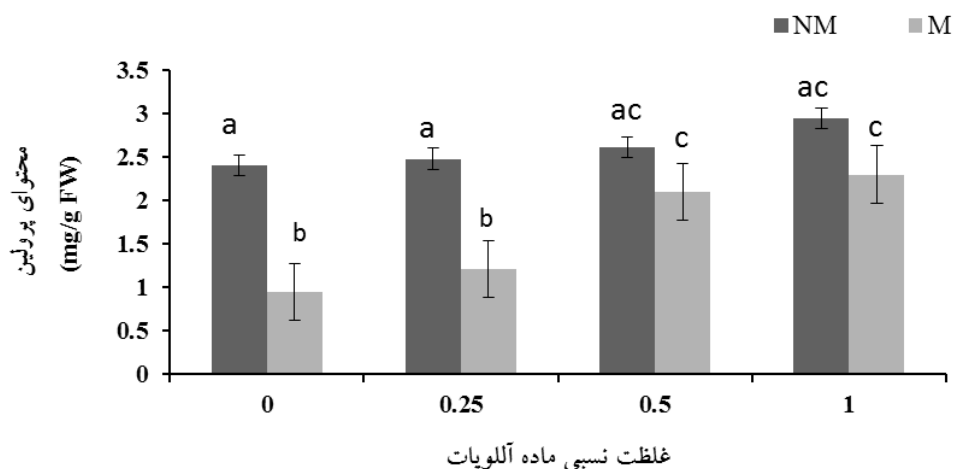
شکل ۴- تغییرات محتوای پروتئین کل اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

مقدار کلروفیل در نمونه‌های میکوریزی را می‌توان به بالا بودن جذب فسفر به عنوان یک حامل انرژی در طی فرایند فتوسنتز نسبت داد. افزایش محتوای کلروفیل‌های a و b در برگ‌های *Prosopis juliflora* همزیست با *G. fasciculatum* مشاهده شده است (Selvaraj and Chellappan, 2006). همچنین Demir (۲۰۰۴) نشان داده است که مقدار کلروفیل گیاهان فلفل همزیست با قارچ *G. intraradices* در مقایسه با گیاهان شاهد غیرمیکوریزی بالاتر بوده است. همچنین نتایج نشان دهنده کاهش محتوای کلروفیل a و b در همزمان با افزایش غلظت ماده آلوپات بوده است. در زمینه اثر اسانس‌ها و متابولیت‌های گیاهی بر محتوای رنگدانه‌ای گیاهان، بررسی‌های بسیاری صورت گرفته

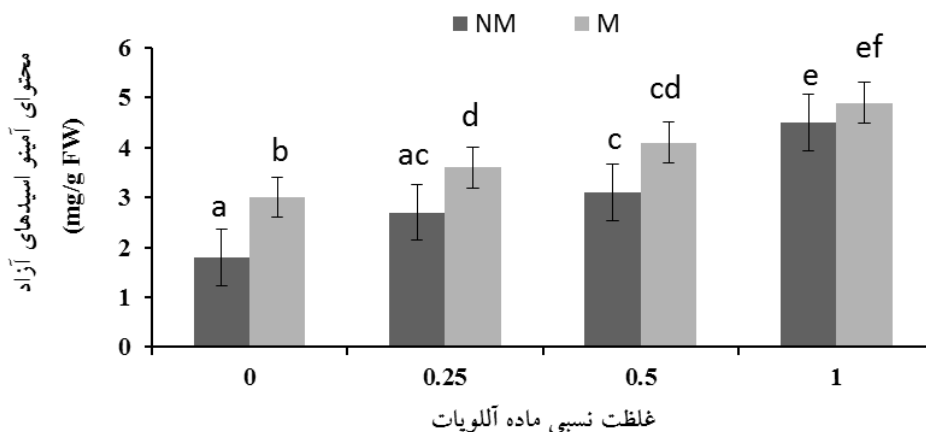
تنش‌های محیطی اهمیت دارند. نتایج حاصل از بررسی فعالیت این آنزیم‌ها در اندام هوایی گیاهان میکوریزی و غیر میکوریزی، تحت غلظت‌های مختلف ماده آلوپات در شکل‌های ۷ و ۸ آورده شده است. مطابق نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های مربوطه، با افزایش عصاره‌ی آبی برگ گردو فعالیت آنزیم‌های APX و GPX در اندام هوایی گیاهان شاهد و میکوریزی افزایش یافت.

بحث:

رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج آزمایش‌ها نشان داد که تیمارهای میکوریزی دارای محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بالاتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی می‌باشند. بالا بودن



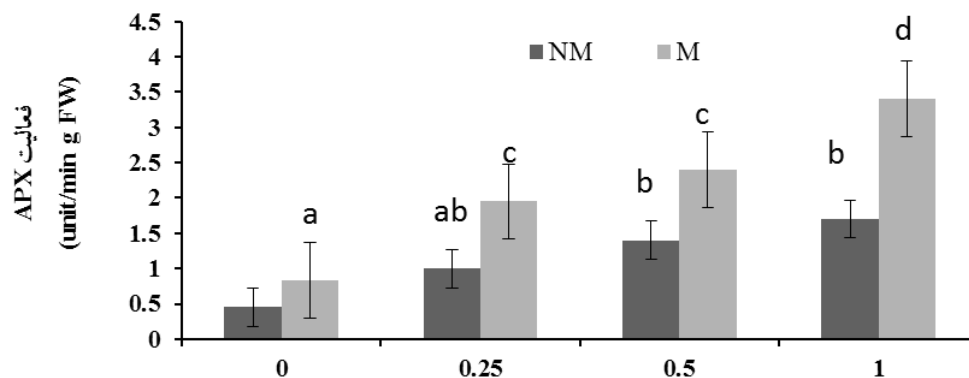
شکل ۵- تغییرات محتوای پرولین کل اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).



شکل ۶- تغییرات محتوای آمینو اسیدهای آزاد در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

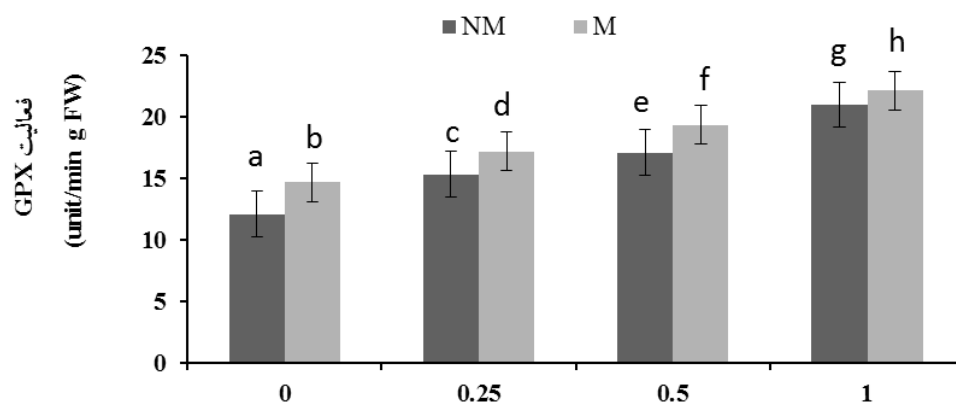
به دگرآسیبی، مهار رشد گیاهان در معرض مواد آلوشیمیایی با کاهش کلروفیل در آنها همراه بوده است. ممکن است این کاهش کلروفیل یک اثر ثانویه ناشی از عملکرد مواد آلوشیمیایی ویژه باشد (Babu and Kandasamy, 1997). کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند بر اثر افزایش فرایندهای متابولیک مربوط به سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی جدید باشد. علاوه بر این، کاهش کلروفیل ممکن است مربوط به آسیب‌هایی باشد که به سیستم‌های فتوسنتزی وارد آمده است (Al-Juboori and Ahmad, 1994). کاروتنوئیدها رنگدانه‌های گیاهی هستند که به عنوان

است. ابراهیمی کیا در سال ۱۳۷۹ کاهش میزان کلروفیل در گیاهان تره تیزک، ترشک، سوروف، یولاف وحشی و ذرت را در معرض غلظت‌های مختلف عصاره آبی اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) گزارش کرده است. همچنین در یک بررسی اسانس برگ گیاه *Eucalyptus globulus* میزان کلروفیل گیاهان *Phaseolu saureus* و *Lens esculentum* را کاهش داده است (Kohli and Singh, 1991). طیف وسیعی از مواد آلوشیمیایی قادرند با تغییر مقدار کلروفیل، فرایند فتوسنتز گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند. در بیشتر گزارش‌های مربوط



غلظت نسبی ماده آلوپات

شکل ۷- تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).



غلظت نسبی ماده آلوپات

شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

Amaryllis را گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد اسانس برگ درخت گردو سبب تخریب غشاهای زیستی اندام‌های نظیر میتوکندری و هسته شده (Fischer, 1991) و آسیب‌هایی از این دست، سبب تحریک سنتز و فعالیت رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاروتنوئیدها می‌شود.

پروتئین کل، پرولین و آمینواسیدهای آزاد: نتایج آزمایش‌ها نشان داد که افزایش غلظت ماده آلوپات باعث کاهش محتوای پروتئین کل در گیاهان غیرمیکوریزی می‌شود. به نحوی که در گیاهان میکوریزی غلظت یک

ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ترکیبات ضروری دستگاه فتوسنتزی ایفای نقش می‌کنند. همچنین این ترکیبات در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن در کمپلکس فتوسنتزی دخالت دارند (Howitt and Pogson, 2006). مشاهده Grassmann در سال ۲۰۰۵ دلالت بر این دارد که مواد مؤثر موجود در اسانس‌های روغنی به عنوان عوامل آلوپاتیک، سبب افزایش آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌شوند. همچنین، El-Rokiek و Eid (۲۰۰۹) اثر افزایشی عصاره *Eucalyptus citriodora* بر کاروتنوئید برگ‌های تازه‌ی

همچنین، Nemec و Meredith (۱۹۸۱) نشان داده‌اند که مقدار کل اسیدآمینو برگ‌ها در مرکبات میکوریزی نسبت به انواع غیر میکوریزی افزایش می‌یابد. مطالعات نشان می‌دهند جذب نیتروژن در گیاهان میکوریزی افزایش می‌یابد که می‌تواند از عوامل افزایش پروتئین‌های محلول در این گیاهان باشد (Cheng and Baumgartner, 2006).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: برای محافظت سلول در برابر تنش‌های اکسیداتیو، بافت‌های گیاهی دارای آنزیم‌های حذف‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز، ترکیبات سمیت‌زدا در برابر لیپوکسیژنازاها (گلوتاتیون S-ترانسفراز و آسکوربات پراکسیداز) و شبکه‌ای از آنتی اکسیدان‌های کم وزن (آسکوربات، گلوتاتیون، ترکیبات فنلی و توکوفرول‌ها) هستند (Bolikhina et al., 2003). آنزیم گایاکول پراکسیداز از آنزیم‌هایی است که پراکسید هیدروژن تولید شده طی تنش‌های اکسیداتیو را از طریق گلوتاتیون احیایی کاهش می‌دهد (Bolikhina et al., 2003).

تحقیق‌ها نشان داده‌اند که مواد آللوپات علاوه بر جوانه‌زنی و رشد بر فرایندهای متابولیک نظیر تنفس، فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌ها نیز تاثیر می‌گذارند. به عنوان مثال، اثر آنها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز مشخص شده است (Williams and Hoagland, 1982). بعضی از آللوکمیکال‌ها فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را افزایش و برخی دیگر، از فعالیت این آنزیم‌ها کم می‌کنند. با توجه به این موضوع اعلام شده است که در برخی موارد آللوکمیکال ممکن است به طور مستقیم در تولید ROS دخالت کنند و افزایش آنزیم‌های اکسایشی ممکن است پاسخ ثانویه در برابر افزایش رادیکال‌های آزاد باشد. در موارد دیگر، آللوکمیکال‌ها ممکن است به طور مستقیم مانع فعالیت آنزیم‌های اکسایشی از طرق مختلف شوند (Bais et al., 2003). بر اساس مطالعات انجام شده توسط امیدپناه و همکاران (۱۳۹۰) فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ رقم طلایه کلزا در حضور اسانس برگ

چهارم واحد عصاره برگ گردو محتوای پروتئین کل را افزایش و سپس غلظت‌های نیم و یک واحد، آن را کاهش داد. اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز از محتوای پروتئین بیشتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار است. همچنین نتایج نشان دهنده افزایش محتوای پرولین و آمینواسیدهای آزاد در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی، همراه با افزایش غلظت عصاره برگ گردو می‌باشند. علاوه بر این، Kao (۱۹۸۰) گزارش داده که در طی فرایند پیر شدن برگ‌های برنج، تفکیک پروتئین پیش از تخریب کلروفیل صورت می‌گیرد. پودر برگ‌های گردو ممکن است حاوی ترکیباتی مثل گلوکوزینولات یا تیوسیانات باشد که می‌توانند در برگ‌های جعفری پیری را القا کنند. از طرفی تخریب پروتئین‌ها می‌تواند گلوتامات تولید کند. به دنبال آن، Guerrier (۱۹۹۸) با مطالعه روی گوجه فرنگی گزارش داده که گلوتامات آمینواسید اصلی برای بیوسنتز پرولین می‌باشد. در بررسی حاضر به نظر می‌رسد افزایش تولید گلوتامات در اثر پیری القا شده، منجر به افزایش محتوای پرولین در برگ‌های جعفری شده است. به علاوه، تخریب پروتئین باعث تولید پرولین، آمینواسیدی به عنوان یک محافظ اسمزی، و سایر آمینواسیدها می‌شود. گزارش Haddadchi و Masoodi Khorasani (۲۰۰۶) نشان می‌دهد که عصاره‌ی آبی ساقه خردل که دارای خاصیت آللوپاتی است در غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ درصد بیشترین کاهش را در محتوای پروتئین برگ‌های کلزا موجب می‌شود. در تمام تیمارها، افزایش محتوای پرولین برگ‌های کلزا مشاهده شده است.

در مواردی که گیاهان میکوریزی از محتوای پروتئینی بیشتری برخوردارند، مطابق نتایج Chare و Subramanian (۱۹۹۸) می‌توان بیان کرد که همزیستی با این قارچ به گیاه میزبان کمک می‌کند تا غلظت بالایی از پروتئین را در اندام‌های هوایی و ریشه خود حفظ کند. افزایش ۱۷ درصدی غلظت پروتئین با حضور میکوریز در گیاه شبدر توسط Arienes و همکاران (۱۹۹۳) گزارش شده است.

گیاه دارویی مورخوش که دارای پتانسیل آللوپاتیک می‌باشد، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد پیدا می‌کند. به دنبال آن، Niakan و Saberi (۲۰۰۹) در تحقیقات خود نشان داده‌اند که عصاره آبی اکالپیتوس با اثر آللوپاتی باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز موجود در برگ‌های علف هرز *Phalaris* می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌ها در اندام هوایی گیاهان جعفری میکوریزی و غیر میکوریزی تلقیح شده با *Glomus versiforme*، تحت اثر غلظت‌های مختلف ماده‌ی آللوپات نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره‌ی آبی برگ گردو، فعالیت آنزیم‌های APX و GPX در اندام هوایی گیاهان شاهد و میکوریزی افزایش می‌یابد.

رابطه متقابل آللوپات و کلونی‌های میکوریزی:

گزارش‌ها نشان می‌دهند که اکثر گونه‌های گیاهی بیگانه در جوامع بومی کمترین وابستگی را به قارچ‌های میکوریزی دارند (Pendelton and Smith, 1983). به نظر می‌رسد که این گونه‌های غیرمیکوریزی می‌توانند باعث کاهش فراوانی قارچ‌های میکوریزی، تسهیل تهاجم گونه‌های بیگانه و پیشگیری از استقرار دوباره جامعه بومی شوند (Reeves et al., 1990). Vogesgang و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند که در مراعی در کالیفرنیا که مورد هجوم گیاهان بیگانه واقع شده بودند، نشانه‌های کاهش حضور کلونی‌های قارچ AM نسبت به مناطق مجاور دیده می‌شود. بعلاوه، اثرات منفی *Kalmia angustifolia* L. بر روی صنوبر سیاه ممکن است در اثر تلقیح صنوبر با قارچ اکتومیکوریز از بین برود (Wirsal, 2004). یک مطالعه دیگر نشان داده که انتشار میکوریز می‌تواند ساختار سیستم ریشه‌ای گیاهان رقیب و توانایی آنها برای تولید آللوکمیکال‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (Koid and Li, 1991). Li و Koide (۱۹۹۱) گزارش داده‌اند که *Abutilon theophrasti* Medic. به تنهایی در میان آغشتگی پرسود قارچ‌های میکوریز رشد می‌کند؛ اما در حضور *Setaria lutescens* Hubb. اثرات مفید انتشار

میکوریز از بین می‌رود. در این مطالعه، عصاره *S. lutescens* کمترین تاثیر را روی طول ریشه گیاهان میکوریزی *A. theophrasti* داشته است. اگرچه، عصاره گیاهان غیرمیکوریزی *A. theophrasti* تاثیر منفی قابل توجهی روی جذب فسفر و رشد سایر گیاهان هم نوع خود نشان داده است. مطالعات زیادی در جهت بررسی تاثیرات عصاره‌های گیاهی بر روی رشد و متابولیسم قارچ‌های میکوریز وجود دارد که از فرضیه مداخله آللوکمیکال‌ها با آغشتگی میکوریزی حمایت می‌کند. مثلاً، عصاره برگ *Populus tremuloides* L. برای بسیاری از قارچ‌های میکوریز سمی بوده است (Olsen et al., 1971) و عصاره *Rubus idaeus* L. ۵ گونه از قارچ‌های اکتومیکوریز را کاهش می‌دهد؛ در حالی که محرک رشد دو گونه دیگر است (Cote and Thibault, 1988).

نتیجه‌گیری:

در مطالعه حاضر نیز در حضور قارچ میکوریز فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان جعفری بهبود یافت. با افزودن همزمان عصاره آللوپات این روند کاهش پیدا کرد؛ به طوری‌که عصاره یک چهارم واحد به علت مداخله میکوریز نتوانست تاثیر قابل توجهی بر فاکتورهای مورد نظر بگذارد. عصاره‌های یک دوم و غلظت کامل نیز با غلبه بر روابط میکوریزی تاثیر بیشتری بر این فاکتورها گذاشتند. البته اثر عصاره برگ گردو در غلظت‌های مختلف بر گیاهان میکوریزی به مراتب کمتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود که نشان دهنده وجود تداخل بین مواد آللوپات و میکوریز می‌باشد. به این ترتیب، می‌توان چنین نتیجه گرفت که با تلقیح قارچ میکوریز با ریشه گیاهان می‌توان اثرات نامطلوب آللوپات عصاره برگ گردو بر فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه جعفری را کاهش داد.

منابع:

- امیدپناه، ن.، ز. اسرار، و ع. مرادشاهی. ۱۳۹۰. بررسی پتانسیل آللوپاتیک گیاه دارویی مورخوش بر رقم طلایه کلزا. مجله زیست شناسی گیاهی. سال سوم. ۷: ۱-۱۰.
- ابراهیمی کیا، ف. (۱۳۷۹) اثرات آللوپاتیک عصاره آبی و اسانس برگ دو گونه اکالیپتوس بر برخی از علف‌های هرز و گیاهان زراعی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
- عباس دخت، ح. و م. چائی‌چی. (۱۳۸۲) پتانسیل اثر آللوپاتیک کاه و کلش ارقام نخود سیاه بر جوانه‌زنی و رشد سورگوم، سویا و آفتابگردان. مجله علوم کشاورزی ایران ۳۴: ۶۱۷-۶۲۴.
- غدیری، ح. (۱۳۷۲) اصول و روش علم علف‌های هرز (ترجمه). انتشارات دانشگاه شیراز. ۲۵۶ صفحه.
- مسعودی خراسانی، ف.، غ. حدادچی، ن. باقرانی و م. بنیان اول. (۱۳۸۴) اثرات آللوپاتیک عصاره آبی اندامهای مختلف خردل وحشی در غلظت‌های مختلف بر برخی ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر رقم PF کلزا. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. سال دوازدهم ۵: ۷۳-۸۰.
- Abu-Romman, S., Shatnawi, M. and Shibli, R. (2010) Allelopathic effects of spurge on wheat. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 7: 298-302.
- Aliasgharzad, N., Shirmohamadi, E. and Oustan, S. (2009) Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil and Environment 28: 119-123.
- Al-Juboory, B. A. and Ahmad, M. M. (1994) The allelopathic effects of plant residues on some weed plants. Arab Journal of Plant Protection 12: 3-10.
- Allen, E. B. and Allen, M. F. (1980) Natural reestablishment of vesicular arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. Journal of Applied Ecology 17: 139-147.
- Arienes, J., Polma, J. M. and Varion, A. (1993) Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and VA mycorrhizal roots of red clover. New Phytologist. 123: 763-768.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxidase scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum 85: 235-241.
- Babu, R. C. and Kandasamy, O. S. (1997) Allelopathic effects of *Eucalyptus globules* Labill. on *Cyperus rotundus* L. & *Cynodon dactylon* L. Pers. Journal of Agronomy and Crop Science 179: 123-126.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M. and Vivanco, J. M. (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. Science 301: 1377-1380.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
- Bolkhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. A review. Annals of Botany 91: 179-194.
- Cheng, X. and Baumgartner, K. (2006) Effects of mycorrhizal roots and extraradical hyphae on ¹⁵N uptake from Vineyard clover crop litter and the soil microbial community Soil Biochemistry 38: 2665-3675.
- Cote, J. F. and Thibault, J. R. (1988) Allelopathic potential of raspberry foliar leachates on growth of ectomycorrhizal fungi associated with black spruce. American Journal of Botany 75: 966-970.
- Daglish, C. (1950) The determination and occurrence of hydrojuglone glucoside in the walnut. Biochemical Journal 47: 458-462.
- Demir S. (2004) Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology 28: 85-90.
- El-Rokiek, K. G. I. and Eid, R. A. (2009) Allelopathic effects of *Eucalyptus citriodora* on *Amaryllis* and associated grassy weed. Planta Daninha 27: 887-899.
- Fischer, N. H. (1991) Plant terpenoids as allelopathic agents. In: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Clarendon press: Oxford 377-398.
- Grassmann, J. (2005) Terpenoids as plant antioxidants. Vitamins and Hormones 72: 505-535.
- Guerrier, G. (1998) Proline accumulation in salt treated tomato: different proline precursors in *Lycopersicon pennelli*. Journal of Plant Nutrition 10: 22-26.
- Haddadchi, Gh. and Masoodi Khorasani F. (2006) Allelopathic effects of aqueous extracts of *Sinapis arvensis* on growth and related physiological and biochemical responses of

- Niakan, M. and Saberi, K. (2009) Effects of *Eucalyptus* allelopathy on growth characters and antioxidant enzymes activity in *Phalaris* Weed. Asian Journal of Plant Sciences 8: 440-446.
- Olsen, R. A., Odham, G. and Lindberg, G. (1971) Aromatic substances in leaves of *Populus tremula* as inhibitors of mycorrhizal fungi. Journal of Ecology 60: 219-224.
- Pendelton, R. M. and Smith, B. N. (1983) Vesicular-arbuscular mycorrhizae of weedy and colonizer plant species at disturbed sites in Utah. Oecologia 59: 296-301.
- Reeves, F. B., Wagner, D., Moorman, T. and Kiel, J. (1980) The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. I. A comparison of incidence of mycorrhizae in severely disturbed vs. natural environments. American Journal of Botany 66: 6-13.
- Rietveld, W. J. (1983) Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. Journal of Chemical Ecology 9: 295-308.
- Selvaraj, T. and Chellappan, P. (2006) Arbuscular mycorrhizae: Review paper. Journal of Central European Agriculture 7: 349-358.
- Subramanian, K. S. and Chare, C. (1998) Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. Physiologia Plantarum 102: 285-296.
- Upadhyaya, A. and Sankhla, D. (1985) Effect of Paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Plant Physiology 121: 453-461.
- Vogesgang, K. M., Bever, J. D., Griswold, M. and Schultz, P. A. (2005) The use of mycorrhizal fungi in erosion control applications. Final Report - Sacramento Department of Transportation, Sacramento, California, USA. Contract No. 65A0070. pp. 150.
- Williams, R. D. and Hoagland, E. (1982) The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. Weed Science 30: 206-215.
- Wirsal, S. G. R. (2004) Homogenous stands of a wetland grass harbor diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Ecology. 48: 129-138.
- Xiong, Z. T., Chao, L. and Bing, G. (2006) Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. Ecotoxicology and Environmental Safety 64: 273-280.
- Brassica napus*. Journal of Science University of Tehran 32: 23-28.
- Howitt, A. C. and Pogson, B. J. (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. Plant, Cell and Environment 29: 435-445.
- Kamal, J. and Bano, A. (2009) Efficiency of allelopathy of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on physiology of wheat (*Triticum aestivum* L.). African Journal of Biotechnology 8(15): 3555-3559.
- Kang, H. M. and Saltveit M. E. (2002) Reduced chilling tolerance in elongating cucumber seedling radicles is related to their reduced antioxidant enzyme and DPPH-radical scavenging activity. Physiologia Plantarum 115: 244-250.
- Kocacaliskan, I. and Terzi, I. (2001) Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76: 436-440.
- Kao, C. H. (1980) Senescence of rice leaves IV. Influence of benzyl-adenine on chlorophyll degradation. Plant Cell Physiology 21: 1255-1262.
- Kohli, P. K. and Singh, D. (1991) Allelopathic impact of volatile components from *Eucalyptus* on crop plants. Biologia Plantarum 33: 475-483.
- Koide, R. T. and Li, M. (1991) Mycorrhizal fungi and the nutrient ecology of three old field annual plant species. Oecologia 85: 403-412.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591-592.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. S., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.
- Malik, A. (2005) Allelopathy: Advances, challenges and opportunities. Fourth World Congress on Allelopathy. 21-26 Aug 2005, Charles Sturt University, WaggaWagga, Australia.
- Narwal, S. S. and Tauro, P. (1996) Suggested methodology for allelopathy laboratory bioassay In: Allelopathy: Field Observations and Methodology., (Ed. Narwal S. S.) pp: 255-260. Scientific Publishers, Jodhpur.
- Nemec, S. and Meredith, F. I. (1981) Amino acid content of leaves in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus rootstocks. Annals of Botany 47: 351-358.