

## پاسخ‌های فیزیولوژیکی و رشدی دوازده ژنوتیپ رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) به پتانسیل آب در مرحله‌ی جوانه‌زنی

احسان عسکری<sup>۱</sup>، پرویز احسان زاده<sup>۱\*</sup> و حسین زینلی<sup>۲</sup>

اگرچه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰)

### چکیده:

کمبود آب از مشکلات رو به تزاید کشاورزی ایران است و تهدیدی برای آینده این صنعت و امنیت غذایی کشور محسوب می‌شود. جوانه‌زنی یکی از مراحل حساس در طول دوره رشد گیاهان است که اغلب تحت تاثیر تنش‌های محیطی بویژه خشکی قرار می‌گیرد. در این تحقیق، اثر چهار سطح پتانسیل آب (۰/۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶- مگاپاسکال) بر روی جوانه‌زنی، صفات گیاهچه‌ای، محتوی کربوهیدرات‌های محلول، پرولین و پلی‌فنول‌ها، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دوازده ژنوتیپ رازیانه مورد مطالعه قرار گرفت. با تشدید خشکی (کاهش پتانسیل آب) از درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، طول ساقه‌چه و فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاسته شد، در حالیکه بر طول ریشه‌چه، محتوی قندهای محلول، پلی‌فنول‌ها و پرولین، و فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز افزوده شد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس درصد جوانه‌زنی و بر مبنای میزان کاهش آن در پتانسیل ۰/۶- مگاپاسکال نسبت به شاهد، به سه گروه متحمل (شیراز، یزد، کرمان و مشهد)، نیمه‌حساس (همدان، کاشان، بوشهر و ارومیه) و حساس به خشکی (بیرجند، اردبیل، ابن سینا و اصفهان) تقسیم‌بندی شدند. ژنوتیپ مشهد در بین دوازده ژنوتیپ مورد مطالعه، با داشتن بالاترین درصد جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، طول ریشه‌چه، محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین، و فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز متحمل‌ترین ژنوتیپ بود. نتایج برگرفته از این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی درباره صفات مرتبط با تحمل خشکی گیاه رازیانه در مرحله جوانه‌زنی ارائه می‌دهد، به طوریکه تلفیق این نتایج با داده‌های حاصل از آزمایشات مزرعه‌ای شناختی کاربردی از کشت این گیاه دارویی در مناطق کم آب را فراهم می‌سازد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، پلی‌اتیلن‌گلیکول، پلی‌فنول، جوانه‌زنی، قندهای محلول

### مقدمه:

حتی در مناطق خشک و نیمه خشک جهان دارد. رازیانه گیاهی دیپلوئید (2n = 22) و از خانواده چتریان (Apiaceae) است. این گیاه معطر به صورت یک، دو و یا چند ساله کشت می‌شود و ارتفاع آن تا ۲ متر می‌رسد. ظاهر کلی این گیاه به خصوص برگ‌های آن شبیه به گیاه شوید است ولی عطر و طعم متفاوت، ساقه مرتفع و ریشه ضخیم گیاه به سهولت آن را از شوید متمایز می‌سازد. گل‌های آن زرد رنگ و مجتمع به

درصد بالایی از جمعیت هفت میلیاردی جهان برای بهبود سلامتی، دارو و غذا به گیاهان دارویی وابسته‌اند. بازار بین المللی گیاهان دارویی در جهان بیش از ۶۰ میلیارد دلار است و نرخ رشد این بازار سالانه ۷ درصد می‌باشد (Hashmi et al., 2012). در بین گیاهان دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) از موقعیت ممتازی برخوردار است و پراکندگی وسیعی

\*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: ehsanp@cc.iut.ac.ir

یکی از مراحل حساس در چرخه رشدی گیاهان به حساب می آید به طوریکه این مرحله دوام، استقرار، تراکم و عملکرد نهایی گیاهان را تا حد زیادی متأثر می سازد (Hosseini and Rezvani Moghadam, 2006).

برخی از گیاهان ممکن است در مراحل پس از استقرار، متحمل به تنش‌هایی چون شوری و خشکی محسوب شوند، ولی این بدان معنی نیست که لزوماً از ابتدا و در مرحله جوانه زنی در مقابل تنش‌های محیطی مقاوم هستند. به فرض مثال بایونه در مراحل رشد رویشی متحمل به خشکی است، در حالیکه در مرحله جوانه‌زنی حساس به خشکی است و کمبود آب خسارت زیادی به آن وارد می‌کند ( Hosseini and Rezvani Moghadam, 2006). همچنین Masoumi و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که تنش خشکی باعث کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی و همچنین کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در ژنوتیپ‌های مختلف نخود شده است. در زمان خشکی اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و کربوهیدرات‌های محلول به منظور تنظیم اسمزی و حفظ تورژسانس در سلول‌های گیاهی تجمع پیدا می‌کنند. پرولین در سلول نقش کلیدی برای تنظیم اسمزی و همچنین پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن بازی می‌کند (Mittler, 2002)، در حالی که کربوهیدرات‌ها برای حفظ متابولیسم سلول و ذخیره انرژی در دوره خشکی به کار می‌روند (Khalid et al., 2010). تنش خشکی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، شروع‌کننده تنش دیگری به نام تنش اکسیداتیو است (Parida et al., 2007). گونه‌های فعال اکسیژن باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تخریب کلروفیل می‌شوند. گیاهان برای جمع‌آوری و پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن مکانیسم‌های ویژه‌ای چون فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند کاروتنوئیدها، گلوکاتایون، آسکوربیک اسید و پرولین را به کار می‌بندند (Mittler, 2002). مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارقام مقاوم و حساس به خشکی در گیاهان مختلف نشان داده است که مقاومت به خشکی همبستگی بالایی با سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد دارد (Azooz, 2009).

صورت چتر مرکب است. قسمت‌های مورد استفاده این گیاه ریشه ضخیم، برگ و میوه آن است. این گیاه بومی جنوب غرب آسیا، جنوب اروپا و شمال آفریقا می‌باشد و منشاء آن را منطقه مدیترانه می‌دانند (رنجبریان و همکاران، ۱۳۸۳). رازیانه از سالیان دور در ایران مصارف غذایی و دارویی داشته است. امیر تیموری و همکاران (۱۳۹۰)، در مطالعه‌ای که بر اساس آمارهای فائو بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۸ انجام شده بود، ایران را در بین ۱۰ کشور صادر کننده عمده رازیانه در جهان قرار داده و با توجه به شاخص‌های مزیت نسبی، اعلام کردند که ایران رتبه هفتم را در مزیت نسبی صادرات رازیانه در بین ۱۰ کشور عمده صادر کننده این محصول (افغانستان، بلغارستان، چین، مصر، آلمان، هند، ایران، سنگاپور، سوریه و ترکیه) دارد و در نتیجه این محصول قدرت رقابتی در سطح بین‌المللی را دارا می‌باشد. میوه رازیانه در قیاس با دیگر قسمت‌های گیاه از اسانس بسیار بالاتری برخوردار است. ترکیب‌های شاخص در اسانس این گیاه ترانس‌آنتول، لیمونن، فنچون و میتل کویکول هستند (Darzi et al., 2005).

از آنجایی که کمبود آب و تنش خشکی حاصل از آن، یکی از بزرگترین موانع تولید محصولات زراعی در مناطق خشک و نیمه خشک از جمله ایران به حساب می‌آید، شناختی جامع از واکنش گیاهان به این تنش در مراحل مختلف رشدی و معرفی ارقام یا توده‌هایی که در شرایط خشکی بهتر از دیگر ارقام عمل کنند، حیاتی به نظر می‌رسد. بسیاری از گیاهان دارویی به طور طبیعی در زیست بوم‌های مختلف و حتی در مناطق خشک و نیمه خشک پراکندگی وسیعی دارند. به دلیل آنکه کشت صنعتی گیاهان دارویی قدمت زیادی ندارد، بنابراین فشار بر روی گونه‌ها به منظور اصلاح و معرفی ارقام پرمحصول بسیار کم بوده است. از این رو شاهد گونه‌های وسیعی از گیاهان دارویی هستیم که در قیاس با گیاهان اصلاح شده زراعی، مصرف آب کمتری دارند و تا حد زیادی مقاومت بهتری در برابر تنش‌های محیطی از خود نشان می‌دهند. با توجه به شرایط کم آبی که در کشور وجود دارد، حمایت از توسعه کشت و کار گیاهان دارویی منطقی به نظر می‌رسد. جوانه‌زنی

تکرار، در چهار سطح پتانسیل آب (۰/۰، ۰/۲، ۰/۴، و ۰/۶- مگاپاسکال) طراحی شد و جوانه‌زنی دوازده ژنوتیپ رازیانه (ارومیه، همدان، کرمان، شیراز، بیرجند، یزد، اردبیل، ابن‌سینا، کاشان، مشهد، بوشهر و اصفهان)، در این سطوح پتانسیل آب مورد بررسی قرار گرفت. البته در این تحقیق چون مشخص شد که ژنوتیپ‌های مختلف رازیانه در سطوح ۰/۸- و بویژه ۱/۰- مگاپاسکال جوانه‌زنی چندانی نداشتند، بنابراین آزمایش با استفاده از ۴ سطح صفر (شاهد)، ۰/۲- (خشکی ملایم)، ۰/۴- (خشکی متوسط) و ۰/۶- مگاپاسکال (خشکی شدید) انجام پذیرفت. پتانسیل‌های مختلف آب توسط غلظت‌های متفاوت پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (Poly Ethylene Glycol, PEG) و طبق روش Michel و Kaufmann (۱۹۷۳) تهیه گردید. بذور رازیانه در پتری دیش‌هایی با قطر ۷ سانتی‌متر که در کف آنها چهار لایه کاغذ صافی واتمن قرار داده شده بود کاشته شدند. در هر پتری دیش تعداد ۵۰ بذر از ژنوتیپ مورد نظر قرار گرفت و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده به آن اضافه شد. سپس همه پتری دیش‌ها با محتویات درون آنها با ترازوی دقیق توزین شدند. در ادامه آزمایش، با توزین روزانه پتری دیش‌ها، میزان آب تبخیر شده از هر پتری دیش محاسبه و با اضافه کردن آب مقطر جبران شد. پتری دیش‌ها به طور روزانه بازبینی و بذرهایی که ریشه‌چه آنها قابل رویت بود (دو میلیمتر و بیشتر از آن)، به عنوان بذره‌های جوانه‌زده شمارش شد. در روز آخر آزمایش (روز چهاردهم)، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن تر گیاهچه‌ها، محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین، و فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن خشک نمونه‌ها، گیاهچه‌ها برای مدت ۷۲ ساعت در آون ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

**درصد و سرعت جوانه‌زنی:** درصد و سرعت جوانه‌زنی بر

مبنای پنجاه بذر در هر واحد آزمایشی (پتری‌دیش) از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شد (Anjumi and Bajwa, 2005):

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \frac{\text{تعداد بذره‌های جوانه‌زده تا روز } i}{\text{تعداد کل بذرها}} \times 100$$

خاکشور مقدم و همکاران (۱۳۹۰)، نشان دادند که تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلیکول، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و نسبت وزن خشک ریشه‌چه به ساقه‌چه را در گیاه شویید به طور معنی‌داری کاهش داد. آنها در آزمایش جداگانه‌ای بر روی شویید، گزارش کردند که با افزایش سطوح خشکی، میزان پرولین و قندهای محلول بخش هوایی و ریشه و همچنین نسبت پرولین و قندهای محلول بخش هوایی به ریشه افزایش پیدا کرد. مرادی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی اثرات خشکی ناشی از پلی‌اتیلن گلیکول روی رازیانه گزارش کردند که تنش خشکی، درصد جوانه‌زنی، وزن گیاهچه و طول ساقه‌چه را کاهش داد، در حالی که تنش ملایم، طول ریشه‌چه را افزایش داد.

به نظر می‌رسد مجموعه‌ای از صفات فیزیولوژیکی از قبیل محتوی اسمولیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به همراه برخی از صفات رشدی نظیر وزن خشک گیاهچه و طول ریشه‌چه تعیین‌کننده‌ی میزان تحمل خشکی گیاهان در مرحله ی گیاهچه‌ای باشند. بنابراین هدف از انجام این پژوهش در درجه‌ی اول ارزیابی تحمل خشکی دوازده ژنوتیپ رازیانه در مرحله‌ی جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای و معرفی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در این مرحله، و در درجه‌ی دوم بررسی روابط موجود بین برخی از صفات رشدی و فیزیولوژیکی با تحمل خشکی گیاهچه‌های رازیانه بود. اگر ژنوتیپ‌هایی که در مرحله‌ی گیاهچه‌ای متحمل به خشکی هستند در مراحل بعدی رشد نیز به خشکی مقاوم باشند، بنابراین می‌توان از صفاتی که با تحمل خشکی رازیانه در مرحله‌ی گیاهچه‌ای در ارتباط هستند به عنوان شاخص‌های تحمل خشکی در برنامه‌های اصلاحی این گیاه دارویی استفاده کرد.

**مواد و روش‌ها:**

به منظور بررسی اثرات تنش خشکی بر جوانه‌زنی بذره‌های رازیانه، در آزمایشگاه پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان و در اتافک رشد (دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه

آخرین روز آزمایش =  $i$

$$n / (\text{تعداد بذر جوانه زده از روز } n-1) = \sum_{n=1}^i \text{سرعت جوانه زنی}$$

روزهای آزمایش =  $n$

**سنجش محتوی پلی فنول‌ها:** ابتدا نیم گرم از بافت گیاهیچه، با استفاده از اتانول ۹۵ درصد عصاره گیری شد. سپس مواد پلی فنولی با استفاده از واکنشگر فولین و به روش Singh و همکاران (۲۰۰۲) اندازه گیری شد. در این روش ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده با ۱ میلی لیتر واکنشگر فولین با غلظت ۱۰ درصد مخلوط گردید و سپس ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲/۵ درصد به آن اضافه شد. در صورت وجود مواد فنولی محلول به رنگ آبی روشن تا تیره در می آید. محلول به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس با استفاده از جذب محلول آبی رنگ در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (HITACHI-JAPAN U1800) و مقایسه با غلظت‌های استاندارد، غلظت پلی فنول‌ها به دست آمد.

**سنجش محتوی پرولین:** برای تعیین غلظت پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. در ابتدا، برای تهیه معرف نین هیدرین، مقدار ۱/۲۵ گرم از این ماده، داخل ارلن ریخته شد و به آن ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار اضافه گردید. سپس محلول حاصل به آرامی حرارت داده شد تا نین هیدرین به طور کامل حل شود. در مرحله بعد، مقدار نیم گرم از بافت گیاهیچه، در هاون چینی و در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد، به خوبی ساییده شد. ماده همگن حاصل در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، ۲ میلی لیتر از عصاره صاف شده به لوله درب دار منتقل گردید و به آن ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال، اضافه شد. پس از بستن درب لوله‌ها، آن‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و بعد از سرد شدن، به هر یک از لوله‌ها مقدار ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه شد. برای مخلوط کردن این دو

محلول، به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه لوله‌ها تکان داده شدند. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز در آمده و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود، جدا گردید. استانداردهایی از پرولین از غلظت صفر تا ۰/۱ میکرومول بر میلی لیتر تهیه گردید و نهایتاً میزان جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. از تولوئن بعنوان محلول شاهد (بلانک) استفاده گردید.

**سنجش محتوی قندهای محلول:** برای اندازه گیری میزان قندهای محلول از روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) استفاده گردید. در ابتدا، برای تهیه عصاره الکلی، نیم گرم از بافت گیاهیچه به همراه پنج میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد در داخل هاون چینی کوبیده و له شد. قسمت بالایی محلول حاصل، جدا گشت و رسوبات آن دو بار با پنج میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو شد و فاز بالایی آن به قسمت رویی قبلی اضافه گردید. محلول به دست آمده در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از فاز مایع رویی برداشته شد و به کمک میکروپیپت در داخل لوله آزمایش ریخته شد و سه میلی لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی گرم آنترون + ۱۰۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ۷۲ درصد) به آن افزوده گردید. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند تا ماده رنگی تشکیل گردد. پس از خنک شدن نمونه‌ها میزان جذب آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. برای تهیه منحنی استاندارد، از گلوکز محلول‌هایی با غلظت‌های صفر تا ۱۲۰ میلی گرم در لیتر تهیه و کلیه مراحل آزمایش روی آنها انجام گردید و نهایتاً میزان جذب آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه گیری شد.

**سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان:** برای اندازه گیری فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی اکسیدان، ابتدا ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهیچه در یک هاون سرد شده، با یک میلی لیتر بافر استخراج مخلوط و به طور کامل یکنواخت شد. بافر استخراج از پلی وینیل پیرولیدون یک درصد، تریتون X100 نیم درصد و بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH = ۷) تشکیل شده بود. عصاره حاصل با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴

۰/۵ میلی‌مولار، آسکوربات ۵ میلی‌مولار با ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیم مخلوط گردید. فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز مطابق با روش مشروح در سنجش آنزیم کاتالاز محاسبه شد.

$$\text{فعالیت آسکوربات پراکسیداز (U)} = \frac{\Delta A D \times TV \times \epsilon}{\epsilon \times EV}$$

U = یک واحد از فعالیت آسکوربات پراکسیداز که برابر با مقدار آنزیمی است که برای اکسید کردن یک میکرومول آسکوربات در یک دقیقه نیاز است

$\Delta A$  = اختلاف جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت یک دقیقه

TV = حجم کل (بافر واکنش و عصاره) (۳ میلی‌لیتر)

EV = حجم عصاره (۰/۰۵ میلی‌لیتر)

$\epsilon$  = ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز ( $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

D = ضریب رقت

**سنجش فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت**

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش تغییر یافته و اصلاح شده Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار ( $\text{pH} = 7/8$ )، EDTA ۷۵ نانومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۶۳ میکرومولار و ریوفلاوین ۱/۳ میکرومولار اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار گرفته و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک نمونه مشابه ولی نور ندیده به عنوان بلانک و یک نمونه که همه اجزای بافر واکنش به استثنای عصاره آنزیمی را داشت به عنوان شاهد به کار گرفته شد. فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مطابق با روش مشروح در سنجش آنزیم کاتالاز محاسبه شد.

$$\text{فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (U)} = D \times [1 - \left(\frac{\Delta A_c}{\Delta A_s}\right)]$$

U = یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که منجر به مهار ۵۰٪ احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم می‌گردد.

$\Delta A_c$  = اختلاف جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر در نمونه

درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. بخش شفاف واقع در بالای عصاره برای سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به کار گرفته شد.

**سنجش فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز:** با استفاده از روش تغییر

یافته و اصلاح شده Aebi (۱۹۸۳) و با ردیابی اسپکتروفتومتری تجزیه  $\text{H}_2\text{O}_2$  در طول موج ۲۴۰ نانومتر، فعالیت آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۲/۹۵ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار ( $\text{pH} = 7$ ) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار، با ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیم مخلوط گردید. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز از تقسیم فعالیت حجمی کاتالاز بر میزان پروتئین عصاره که به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شده بود، محاسبه گردید.

$$\text{فعالیت کاتالاز (U)} = \frac{\Delta A \times TV \times D}{\epsilon \times EV}$$

$$\frac{\text{فعالیت کاتالاز (U)}}{\text{واحد حجم (ml)}}$$

$$\text{فعالیت حجمی کاتالاز (U/ml)}$$

$$\frac{\text{غلظت پروتئین عصاره (mg/ml)}}{\text{فعالیت کاتالاز (U/ml)}}$$

$$\text{فعالیت ویژه کاتالاز (U/mg protein)}$$

U = یک واحد از فعالیت کاتالاز که مساوی است با مقدار آنزیمی که باعث تجزیه یک میکرومول  $\text{H}_2\text{O}_2$  و تبدیل آن به اکسیژن و آب در مدت یک دقیقه می‌شود

$\Delta A$  = اختلاف جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه

TV = حجم کل (بافر واکنش و عصاره) (۳ میلی‌لیتر)

EV = حجم عصاره (۰/۰۵ میلی‌لیتر)

$\epsilon$  = ضریب خاموشی کاتالاز ( $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

D = ضریب رقت (به فرض مثال اگر در زمان عصاره‌گیری، ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج به ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه گیاهی (یکنواخت شده) اضافه شده باشد، ضریب رقت ۱۰ است)

**سنجش فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت**

آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش تغییر یافته و اصلاح شده Nakano و Asada (۱۹۸۱)، به صورت اسپکتروفتومتری و با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر تخمین زده شد. برای شروع واکنش، ۲/۹۵ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار ( $\text{pH} = 7$ )، پراکسید هیدروژن

شاهد (بدون عصاره آنزیمی) و در مدت یک دقیقه

$\Delta As$  = اختلاف جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر در نمونه

اصلی (حاوی عصاره آنزیمی) و در مدت یک دقیقه

D = ضریب رقت

آزمون بردفورد برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین در محلول

عصاره گیاهی: روش Bradford (۱۹۷۶) یک سنجش

کلرومتریکی با استفاده از اسپکتروفتومتر است به منظور ساختن

یک منحنی استاندارد که برای محاسبه غلظت پروتئین نمونه به

کار می‌رود.

تهیه معرف برد فوردد: ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بلو

(G250) در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد و سپس

۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵ درصد به آن اضافه گردید.

بعد با اضافه کردن آب دو بار تقطیر به محلول، به حجم یک

لیتر رسانده شد. محلول حاصل با استفاده از کاغذ واتمن

شماره یک فیلتر شد. لازم به ذکر است که معرف بردفورد در

ظرف شیشه‌ای کدر (نور به آن نرسد) تا چندین هفته در دمای

اتاق قابل نگهداری است و چنانچه رسوب دهد، می‌توان

محلول را مجدداً فیلتر نمود و دوباره از آن استفاده کرد.

تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد: مقدار یک میلی‌گرم از

پروتئین آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin=BSA)

در یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد تا غلظت پروتئین

استاندارد یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر باشد. دمای نگهداری برای

این محلول ۲۰- درجه سانتیگراد است.

تهیه منحنی استاندارد: مقادیر ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰

میکرولیتر از محلول پروتئین استاندارد، به طور جداگانه در

لوله‌های شیشه‌ای اتوکلاو شده ریخته شد و به ترتیب مقادیر

۹۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ و صفر میکرولیتر آب دو بار تقطیر به

لوله‌ها اضافه شد تا حجم محلول نهایی در هر لوله ۱۰۰

میکرولیتر باشد. به علاوه درون یک لوله شیشه‌ای ۱۰۰ میکرو

لیتر آب دو بار تقطیر ریخته شد و از آن برای بلانک کردن

اسپکتروفتومتر استفاده گردید. سپس پنج میلی‌لیتر از معرف

بردفورد درون هر لوله ریخته و خوب هم زده شد. فاصله

زمانی دو دقیقه تا یک ساعت پس از اختلاط معرف با نمونه‌ها،

بهترین زمان برای سنجش نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر است.

سپس جذب نمونه‌ها در برابر نمونه بلانک در طول موج ۵۹۵

نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی استاندارد رسم گردید.

تعیین پروتئین نمونه عصاره گیاهی: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر

از عصاره گیاهی استخراج شده (از همان عصاره‌ای که برای

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد)، در درون لوله آزمایش

ریخته شد و به آن مقدار پنج میلی‌لیتر از معرف بردفورد اضافه

گردید و پس از گذشت حداقل دو دقیقه از این اختلاط، میزان

جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر

اساس مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت پروتئین بر حسب

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های برگرفته از این آزمایش، با

استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه واریانس شدند و برای

رسم نمودارها از نرم افزار Excell بهره گرفته شد و همچنین از

آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵

درصد برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده گردید.

### نتایج و بحث:

جوانه‌زنی و خصوصیات رشدی: اثر سطوح مختلف خشکی بر

درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، و طول

ساقه‌چه و ریشه‌چه‌ی رازیانه در سطح احتمال یک درصد

معنی‌دار بود (جدول ۱). با کاهش پتانسیل آب و افزایش

خشکی، درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه،

و طول ساقه‌چه به طور معنی‌داری کاهش یافتند، در حالیکه

طول ریشه‌چه در ابتدا و با خشکی خفیف افزایش یافت و در

خشکی‌های شدیدتر رو به کاهش نهاد (جدول ۲ و شکل ۱).

بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه،

و طول ساقه‌چه در شرایط شاهد (پتانسیل صفر مگاپاسکال)، و

کمترین میزان صفات فوق‌الذکر در شرایط خشکی شدید (-

پتانسیل ۰/۶- مگاپاسکال) مشاهده شد. بیشترین طول ریشه‌چه

متعلق به شرایط خشکی ملایم (پتانسیل ۰/۲- مگاپاسکال) و

کمترین طول ریشه‌چه متعلق به شرایط خشکی شدید (پتانسیل

۰/۶- مگاپاسکال) بود (جدول ۲). کاهش درصد و سرعت

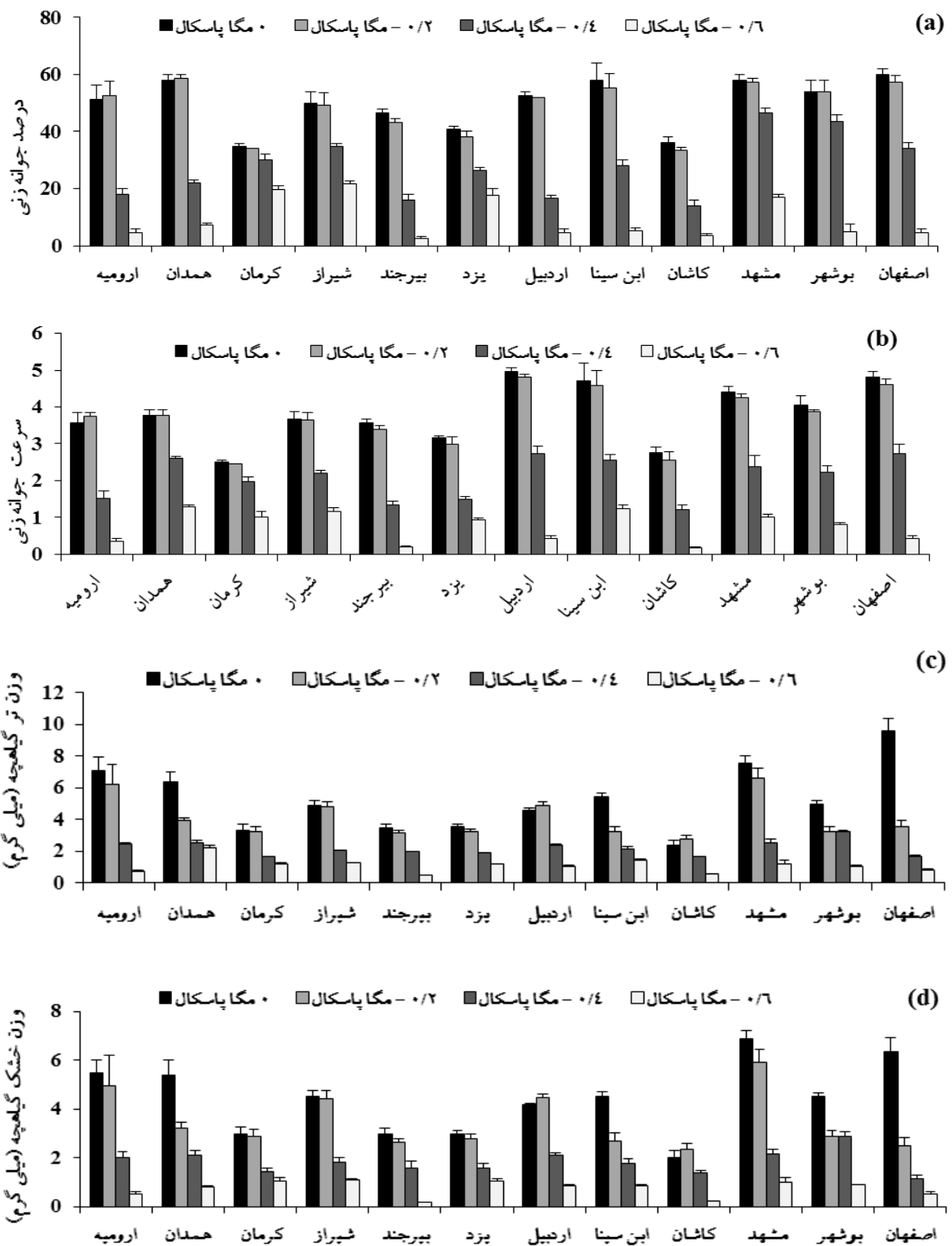


غذایی، میزان بیشتری از مواد مورد نیاز برای رشد گیاهچه را در اختیار جنین قرار می‌دهند. بنابراین آنها اندازه و ذخیره غذایی بذور را تعیین کننده‌ی خصوصیات رشدی گیاهچه در ژنوتیپ‌های مختلف معرفی کردند. در مطالعه مرادی و همکاران (۱۳۹۱) اختلاف معنی داری بین ۱۵ توده‌ی رازیانه از نظر وزن تر و خشک ساقه‌چه، و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه گزارش شد.

اثر متقابل سطوح خشکی  $\times$  ژنوتیپ روی درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه‌ی رازیانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). حداکثر درصد و سرعت جوانه‌زنی به ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های مشهد و اردبیل در شرایط شاهد (پتانسیل صفر مگاپاسکال) و حداقل درصد و سرعت جوانه‌زنی به ترتیب به ژنوتیپ‌های بیرجند و کاشان در شرایط خشکی شدید (پتانسیل  $-0/6$  مگاپاسکال) تعلق داشت (شکل a1 و b). درصد کاهش جوانه‌زنی در سطح خشکی شدید نسبت به شرایط شاهد، برای هر یک از ژنوتیپ‌های ارومیه، همدان، کرمان، شیراز، بیرجند، یزد، اردبیل، ابن‌سینا، کاشان، مشهد، بوشهر و اصفهان به ترتیب برابر با ۹۰، ۸۷، ۶۶، ۵۶، ۹۸، ۵۶، ۹۲، ۹۱، ۸۹، ۷۰، ۹۰ و ۹۲ درصد بود (شکل a1). این نتایج نشان داد که کاهش درصد جوانه‌زنی در خشکی شدید، بین ژنوتیپ‌های رازیانه تفاوت ایجاد کرد، به طوری که این تفاوت ملاک خوبی برای تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها از نظر مقاومت به خشکی در مرحله‌ی جوانه‌زنی بود. بر این اساس، ژنوتیپ‌های رازیانه مورد مطالعه در این تحقیق به سه گروه مقاوم (شیراز، یزد، کرمان و مشهد)، نیمه‌حساس (همدان، کاشان، بوشهر و ارومیه) و حساس به خشکی (بیرجند، اردبیل، ابن‌سینا و اصفهان) تقسیم‌بندی شدند. در شرایط خشکی شدید (پتانسیل  $-0/6$  مگاپاسکال)، بیشترین کاهش در قیاس با شاهد در صفات وزن تر و خشک گیاهچه، و طول ساقه‌چه به ترتیب در ژنوتیپ‌های اصفهان (۹۱ درصد)، بیرجند (۹۵ درصد) و ابن‌سینا (۸۸ درصد) مشاهده شد که همگی آنها متعلق به گروه حساس به خشکی بودند (شکل c1 و d، و شکل a2). در این شرایط، کمترین

جوانه‌زنی در پتانسیل‌های پایین آب را می‌توان به کاهش سطح شیب پتانسیل آب بین بذر و محیط آن نسبت داد. دانه‌ها برای انجام فرآیند جوانه‌زنی، باید به اندازه‌ی کافی آب جذب نمایند، ولی حضور پلی‌اتیلن گلیکول در محیط کشت سبب افت در پتانسیل آب و متعاقباً باعث کاهش جذب آب توسط دانه می‌شود. با کاهش میزان جذب آب توسط بذر، حرکت مواد ذخیره‌ای دانه و سنتز پروتئین‌ها در جنین کاهش یافته و ادامه رشد گیاهچه با مشکل مواجه می‌شود (Yagmur and Kaydan, 2008). Hanselin و Eggen (۲۰۰۵)، توضیح دادند که خشکی باعث تنش اسمتیک و تاثیر یون‌های ویژه‌ای می‌شود که در نهایت باعث کاهش یا بازدارندگی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه می‌گردد. هماهنگ با این نتایج، مرادی و همکاران (۱۳۹۱) کاهش معنی‌دار جوانه‌زنی دانه‌های رازیانه در پتانسیل‌های پایین‌تر از  $-0/2$  مگاپاسکال را گزارش کردند و نشان دادند که با کاهش پتانسیل آب از صفر به  $-0/2$  و  $-0/4$  مگاپاسکال، وزن خشک گیاهچه در ژنوتیپ‌های مختلف رازیانه کاهش یافت. Yamamoto و همکاران (۱۹۹۷) بیان کردند که کاهش میزان پتانسیل آب، میزان آب کمتری در اختیار بذر قرار می‌گیرد و در نتیجه تورژانس سلول‌های گیاهچه بذر کاهش می‌یابد. کاهش تورژانس سلولی، بزرگ شدن سلول‌ها و تقسیم آنها را نقصان داده و در مجموع کاهش رشد، وزن و طول گیاهچه را در پی خواهد داشت. ژنوتیپ‌های رازیانه‌ی مورد مطالعه در این تحقیق از نظر درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان دادند (جدول ۱). بیشترین درصد جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، و طول ریشه‌چه به ژنوتیپ مشهد تعلق داشت و کمترین درصد و سرعت جوانه‌زنی، و وزن تر و خشک گیاهچه در ژنوتیپ کاشان مشاهده شد (جدول ۲). هرچند که اختلاف بین ژنوتیپ‌های رازیانه از نظر وزن تر و خشک، و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه می‌تواند منشاء ژنتیکی داشته باشد، اما کافی و همکاران (۱۳۹۱) این اختلاف را به تفاوت ذخیره‌ی غذایی بذور ژنوتیپ‌های مختلف مربوط دانستند و نتیجه گرفتند که بذوری با ذخایر غنی از مواد

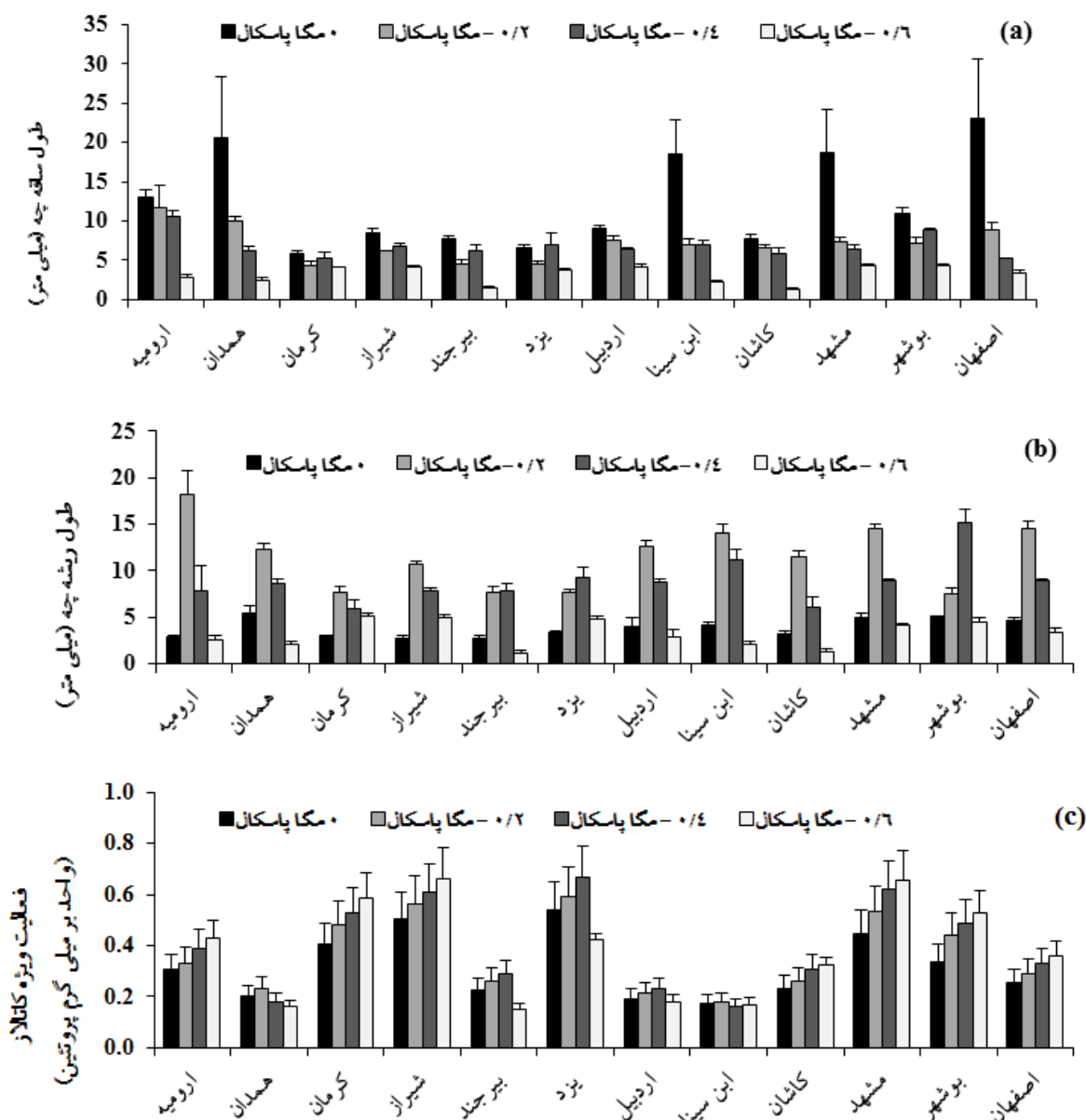




شکل ۱- اثر متقابل سطوح خشکی و ژنوتیپ بر درصد (a) و سرعت (b) جوانه‌زنی، و وزن تر (c) و خشک (d) گیاهچه رازیانه (مقادیر میانگین سه تکرار می‌باشد و بارها نشان دهنده انحراف معیار است).

در شرایط خشکی شدید در ژنوتیپ های شیراز، کرمان و یزد که همگی متعلق به گروه متحمل به خشکی بودند، به ترتیب

کاهش در صفات فوق‌الذکر در ژنوتیپ کرمان مشاهده شد که متعلق به گروه متحمل به خشکی بود. به علاوه، طول ریشه‌چه



شکل ۲- اثر متقابل سطوح خشکی و ژنوتیپ بر طول ساقه چه (a) و ریشه چه (b)، و فعالیت ویژه کاتالاز (c) رازیانه (مقادیر میانگین سه تکرار می باشد و بارها نشان دهنده انحراف معیار است)

کوچک شده‌ای از اندام‌های هوایی ایجاد کند تا تحمل تنش خشکی آسان‌تر شود (اکرم قادری و همکاران، ۱۳۸۷). همچنین محققین، اختلال در انتقال مواد غذایی از بافت‌های ذخیره‌ای بذر به گیاهچه را از دیگر عوامل کاهش رشد ساقه چه در شرایط تنش خشکی می‌دانند (حسینی و رضوانی مقدم، ۱۳۸۵). به علاوه با کاهش پتانسیل آب خاک، میزان آب در دسترس گیاهچه تنزل می‌یابد و این پدیده کاهش تورژسانس سلولی را به همراه دارد. سلول‌هایی که به علت خشکی

۸۲، ۷۲ و ۴۲ درصد در مقایسه با شرایط شاهد افزایش یافت (شکل ۲b). این نتایج به روشنی مشخص کرد که ژنوتیپ‌های متحمل رازیانه در شرایط خشکی در برابر کاهش رشد گیاهچه مقاومت می‌کنند و با توسعه‌ی بیشتر ریشه چه جذب آب را افزایش داده و آثار مخرب خشکی را تخفیف می‌دهند.

یکی از استراتژی‌های عمومی در گیاهان در مواجهه با تنش خشکی، گسترش اندام‌های زیرزمینی و محدود کردن اندام‌های هوایی است تا سیستم کاراتری برای جذب آب به نفع بخش

خشکی در پنبه افزایش سطوح پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین را در پی داشت، به طوریکه افزایش در صفات فوق الذکر در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به ژنوتیپ‌های حساس بالاتر بود. آنها نتیجه گرفتند که پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین از مهمترین املاح سازگار در پنبه هستند که نقشی حیاتی در تنظیم اسمزی، حفظ ماکرومولکول‌های سلولی، سم‌زدایی سلول و جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از تنش خشکی، بازی می‌کنند.

برخلاف این نتایج، Cheruiyot و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که با افزایش تنش خشکی میزان پلی‌فنول‌ها در شش کلون چای کاهش پیدا کرد، هر چند اذعان کردند که در شرایط خشکی کلون‌های متحمل در مقایسه با کلون‌های حساس، از میزان پلی‌فنول بالاتری برخوردار بودند و با افزایش سطوح تنش خشکی، افت پلی‌فنول کمتری داشته و سطح بالای پلی‌فنول‌های خود را حفظ کردند. نجف‌زاده اصل و احسانپور (۱۳۹۱) گزارش کردند که تنش خشکی حاصل از پلی‌اتیلن گلایکول در کشت درون شیشه سیب‌زمینی، محتوی قندهای محلول بخش هوایی گیاهچه را در رقم مقاوم Kenebec افزایش داد. آنها توضیح دادند که قندهای محلول از دو طریق در شرایط تنشی از سلول محافظت می‌کنند. اول آنکه گروه هیدروکسیل قندها طی دهیدراتاسیون غشاء و پروتئین‌ها جایگزین آب در آنها می‌شود و با برقراری پیوندهای هیدروژنی، کمک به حفظ این ساختارها کرده و از تغییر شکل آنها جلوگیری می‌کنند. دوم آنکه قندها در سلول‌های دهیدراته شده از طریق کریستاله شدن، تشکیل بلورهای بیولوژیکی می‌دهند و به پایداری سلول کمک می‌کنند. محققان، افزایش تجزیه کربوهیدرات‌های نامحلول و تبدیل آنها به قندهای محلول؛ سنتز مواد اسمتیک از مسیرهای غیرفتوسنتزی؛ توقف رشد؛ کاهش در انتقال (صادرات) مواد و فعال‌سازی آنزیم ساکارز فسفات سنتاز و افزایش سنتز ساکارز را از جمله دلایل افزایش سطوح قندهای محلول در گیاهان تحت تنش خشکی می‌دانند (خاکشور مقدم و همکاران، ۱۳۹۰). گیاهان تحت تنش خشکی از یک طرف کربوهیدرات‌های محلول را

طراوت و تورژانس مطلوبی ندارند، به خوبی رشد نکرده، به سختی طویل می‌شوند و تقسیم سلولی آنها نیز دچار مشکل می‌شود و همه این عوامل در نهایت باعث نقصان رشد در ساقه‌چه و ریشه‌چه می‌شود (Yamamoto *et al.*, 1997). دیگر مطالعات نتایج مشابهی در رابطه با کاهش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در گونه‌های مختلف از جمله ذرت (Farsiani and Ghobadi, 2009)، بایونه (Afzali *et al.*, 2006) و رازیانه (مرادی و همکاران، ۱۳۹۱) بر اثر تنش خشکی گزارش کرده‌اند، به طوری که در اکثر این مطالعات، نرخ کاهش رشد ناشی از تنش خشکی در ساقه‌چه بیشتر از ریشه‌چه اعلام شده است. در مطالعه‌ای دیگر، مرادی و همکاران (۱۳۹۱)، تنوع زیادی بین ۱۵ ژنوتیپ رازیانه از نظر درصد جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه در شرایط تنش کمبود آب گزارش کردند. به علاوه، آنها ژنوتیپ‌های مشکین‌شهر، فزوه و فسا را متحمل به خشکی و ژنوتیپ‌های اصفهان، چاهستان و ارسباران را حساس به خشکی معرفی کردند.

#### محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین گیاهچه:

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشخص کرد که سطوح خشکی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین گیاهچه‌های رازیانه داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با تشدید خشکی، میزان پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین گیاهچه‌های رازیانه به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، به طوریکه بالاترین سطح صفات فوق‌الذکر در خشکی شدید (پتانسیل ۰/۶ - مگا پاسکال) و پایین‌ترین سطح آنها در شرایط شاهد (پتانسیل صفر مگا پاسکال) مشاهده شد (جدول ۲). ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین گیاهچه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان دادند (جدول ۱). بیشترین میزان پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین گیاهچه به ژنوتیپ مشهد (از گروه متحمل به خشکی) و کمترین آنها به ژنوتیپ بیرجند (از گروه حساس به خشکی) تعلق داشت (جدول ۲). هماهنگ با نتایج مطالعه‌ی حاضر، Parida و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که تنش

متحمل به خشکی) بود، درحالیکه پایین‌ترین مقادیر صفات فوق‌الذکر در ژنوتیپ بیرجند (از گروه حساس به خشکی) مشاهده شد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که پلی‌فنول‌ها، قند-های محلول و پرولین، نقشی کلیدی در ایجاد مقاومت گیاهی‌های رازیانه به خشکی بازی می‌کنند و از این صفات می‌توان به عنوان برخی از شاخص‌های تحمل خشکی در رازیانه در مرحله جوانه‌زنی نام برد.

**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح مختلف خشکی روی فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). اگر چه اثر پتانسیل آب بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار نبود، ولی سطوح خشکی ملایم و متوسط (پتانسیل های ۰/۲- و ۰/۴-مگاپاسکال) فعالیت این آنزیم را نسبت به شاهد افزایش داد و خشکی شدید (پتانسیل ۰/۶- مگا پاسکال) از فعالیت آن کاست (جدول ۱ و ۲). به علاوه، با افزایش سطوح خشکی، فعالیت ویژه کاتالاز افزایش، و فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافت (جدول ۲). ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۱). بیشترین فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های شیراز و مشهد، بیشترین فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ‌های شیراز و یزد، و بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ مشهد مشاهده شد (جدول ۲)، و این در حالی بود که همه‌ی ژنوتیپ‌های فوق‌الذکر متعلق به گروه متحمل به خشکی بودند. کمترین فعالیت ویژه کاتالاز در ژنوتیپ‌های همدان و ابن سینا، کمترین فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ‌های اردبیل و همدان، و کمترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ کاشان مشاهده شد (جدول ۲)، و این در حالی بود که همه‌ی ژنوتیپ‌های اخیر متعلق به گروه حساس یا نیمه‌حساس به خشکی بودند. اثر متقابل ژنوتیپ × سطوح خشکی بر فعالیت

در سلول‌هایشان تجمع می‌دهند و با کاهش پتانسیل آب، موجبات حفظ فشار تورژسانس سلولی را فراهم می‌کنند و از طرف دیگر با افزایش تبدیل قندهای هگزوز و کربوهیدرات‌هایی چون نشاسته و ساکارز به پلی‌اول‌ها و پرولین، تنظیم اسمزی را به طور مؤثرتری به کار می‌بندند. اختلاف در محتوی قندهای محلول در ژنوتیپ‌های مختلف رازیانه، می‌تواند به دلیل تفاوت در فعالیت آنزیم‌های جوانه‌زنی (به فرض مثال آلفا و بتا آمیلاز) و یا به دلیل تفاوت در کیفیت و کمیت ذخیره غذایی بذور در ژنوتیپ‌های مختلف باشد. ژنوتیپ‌هایی با اندازه بذر بزرگ‌تر که حاوی ذخیره‌ی نشاسته‌ای غنی‌تری هستند، مواد اولیه بیشتری برای تولید کربوهیدرات‌های محلول در اختیار جنین قرار می‌دهند. Soliman و El-Shaieny (۲۰۱۴) گزارش کردند که کاهش پتانسیل آب حاصل از تنش شوری باعث افزایش در میزان پرولین پنج گیاه (رازیانه، کرفس، شوید، زیره سیاه و جعفری) از خانواده چتریان شد. Qayyum و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که تنش خشکی حاصل از پلی‌اتیلن گلایکول، محتوی پرولین را به طور معنی‌داری در گیاهیچه پنج رقم گندم افزایش داد. افزایش محتوی پرولین بر اثر تنش خشکی را می‌توان به عوامل گوناگونی از جمله: کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین‌های سلولی، کاهش در فعالیت پرولین اکسیداز، افزایش بیوستنز پرولین از گلوتامات و تمایل به تجزیه پروتئین‌های سلولی به نفع تولید بیشتر آسید آمینه‌هایی چون پرولین که در تنظیم اسمزی به نحو موثری عمل می‌کنند، مربوط دانست (Kishor et al., 1995). انباشت ملکول‌های سازگاری چون اسید آمینه‌ی پرولین در شرایط کم‌آبی، از مهمترین راهکارهای گیاهان به منظور تنظیم فشار اسمزی سلول و به تبع آن حفظ تورژسانس سلولی می‌باشد (Morgan et al., 1986). افزایش پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین در شرایط خشکی، از یک سو باعث تنظیم اسمزی در سلول می‌شود و از سوی دیگر به حفظ ساختارهای مولکولی، سم‌زدایی و پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن در سلول کمک می‌کند. با توجه به اینکه بالاترین مقادیر پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین متعلق به ژنوتیپ مشهد (از گروه

ویژه آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش سطوح خشکی، فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های ارومیه، کرمان، شیراز، کاشان، مشهد، بوشهر و اصفهان به طور پیوسته افزایش یافت، به طوری که فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در این ژنوتیپ‌ها در شرایط شاهد (پتانسیل صفر مگاپاسکال) در پایین‌ترین سطح، و در شرایط خشکی شدید (پتانسیل ۰/۶- مگاپاسکال) در بالاترین سطح قرار داشت (شکل ۲c). در حالی که، در ژنوتیپ‌های همدان، بیرجند، یزد، اردبیل و ابن‌سینا با خشکی ملایم، فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد ولی این افزایش روندی پیوسته نداشت و در خشکی شدید از فعالیت آن کاسته شد. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی مانند کرمان، شیراز و مشهد با افزایش سطوح خشکی روندی افزایشی و پیوسته داشت ولی در ژنوتیپ‌های حساس به خشکی (مانند بیرجند، اردبیل و ابن‌سینا)، در خشکی شدید روندی کاهشی پیدا کرد (شکل ۲c).

Wang و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای که روی دو ژنوتیپ حساس (Northstar) و مقاوم (Xinmu No. 1) یونجه انجام دادند، توضیح دادند که هر چند تنش‌های خشکی و شوری در مرحله جوانه‌زنی، باعث افزایش در فعالیت ویژه آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم شد، ولی رقم متحمل به تنش، به طور چشمگیری نسبت به رقم حساس از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بالاتری برخوردار بود.

بنابراین نتیجه گرفتند که برخورداری از سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد در یونجه، می‌تواند در ایجاد تحمل به تنش‌های خشکی و شوری در مرحله‌ی جوانه‌زنی موثر باشد. کاتالاز مولکول  $H_2O_2$  را به طور مستقیم حذف می‌کند و آن را به مولکول آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. از این رو، این آنزیم به قدرت کاهندگی نیاز ندارد، پس سرعت فعالیت بالایی دارد ولی چون تمایل آن به مولکول  $H_2O_2$  پایین است، فقط غلظت‌های بالای  $H_2O_2$  را حذف می‌کند و در غلظت‌های پایین  $H_2O_2$  خوب عمل نمی‌کند. در عوض آنزیم آسکوربات پراکسیداز با

تمایل بالایی که برای  $H_2O_2$  دارد، این مولکول را در غلظت‌های پایین (تنش‌های ملایم) که برای کاتالاز قابل شناسایی نیست، حذف می‌نماید (Wang et al., 2009). به علاوه، محصول فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کلروپلاست،  $H_2O_2$  است که آنزیم آسکوربات پراکسیداز در حذف آن نقش کلیدی دارد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز، از آسکوربات، به عنوان دهنده‌ی الکترون برای احیای مولکول  $H_2O_2$  استفاده می‌کند (Chaitanya et al., 2002). De Carvalho (۲۰۰۸) توضیح داد که آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به آنزیم کاتالاز در برابر تنش اکسیداتیو حساس‌تر است، از این رو آنزیم آسکوربات پراکسیداز تنها در تنش‌های ملایم از طریق سیکل آسکوربات-گلوتاتیون در حذف  $H_2O_2$  عملکرد مناسبی دارد. چون کاتالاز تمایل کمتری به مولکول  $H_2O_2$  دارد، بنابراین در غلظت‌های بالای  $H_2O_2$  (تنش شدید)، آسیب کمتری می‌بیند و فعال‌تر از آنزیم آسکوربات پراکسیداز عمل می‌کند. مولکول  $H_2O_2$  در غلظت بالا، شدیداً به آنزیم آسکوربات پراکسیداز حمله کرده و باعث بازدارندگی فعالیت آن می‌گردد. هماهنگ با نتایج آزمایش حاضر، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهچه‌های آفتابگردان (Quartacci and Navari-Izzo, 1992) و گیاه *Aegilops squarrosa* (Badiani et al., 1990) در اثر تنش خشکی کاهش پیدا کرد. برخلاف این نتایج، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گندم (Badiani et al., 1990) و نخود (Mittler and Zilinskas, 1994) تحت تنش خشکی افزایش یافت. احیای نوری اکسیژن به رادیکال سوپراکسید که در کلروپلاست و به وسیله فتوسیستم I انجام می‌پذیرد را واکنش مهلر (Mehler Reaction) می‌نامند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با دیسموتاسیون این رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن، نقش مهمی در حفاظت دستگاه فتوسنتزی در برابر تنش اکسیداتیو بازی می‌کند (Chen et al., 2004). De Carvalho (۲۰۰۸) کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اثر خشکی را چنین تفسیر کرد که در شرایط خشکی روزنه‌ها به حالت نیمه بسته در می‌آیند و فرآیند تثبیت

حساس (همدان، کاشان، بوشهر و ارومیه) و حساس (بیرجند، اردبیل، ابن سینا و اصفهان) تقسیم‌بندی شدند. ژنوتیپ‌های متحمل رازیانه در شرایط خشکی در برابر کاهش رشد گیاهچه مقاومت کردند و با توسعه‌ی بیشتر ریشه‌چه جذب آب را افزایش داده و آثار مخرب خشکی را تخفیف دادند. به علاوه مشخص گردید که محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین، و فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در قیاس با ژنوتیپ‌های حساس به خشکی بیشتر است. بنابراین مجموعه‌ی صفات فوق‌الذکر، میزان تحمل خشکی رازیانه در مرحله‌ی گیاهچه‌ای را مشخص می‌کنند. بر طبق نتایج حاصل از این تحقیق، ژنوتیپ مشهد در بین همه‌ی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، با داشتن بالاترین درصد جوانه‌زنی، وزن تر و خشک گیاهچه، طول ریشه‌چه، محتوی پلی‌فنول‌ها، قندهای محلول و پرولین، و فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به عنوان ژنوتیپ برتر و متحمل‌ترین ژنوتیپ به خشکی معرفی شد.

### تشکر و قدردانی:

هزینه اجرای این تحقیق توسط دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شده است.

اثرات تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلیکول بر جوانه زنی و خصوصیات مورفوفیزیولوژیک گیاه شوید (*Anethum graveolens* L.). نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) ۲: ۱۸۵-۱۹۳.

رنجبریان، پ.، صادقیان، س.، شیرازی، م.، صراف نژاد، ع.، فاضلی، م.، امین، غ. و مجلسی، ا. (۱۳۸۳) مطالعه اثر ضد باکتریایی ۴ عصاره گیاهی دارچین، زیره سیاه، رازیانه و شوید بر روی هلیکوباکتریپلوری به روش دیسک دیفیوژن و فلوسیتومتری. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان ۳: ۴۷-۴۲.

دی‌اکسید کربن کاهش پیدا می‌کند. با کاهش در فعالیت فتوسنتزی، تولید رادیکال سوپراکسید که محصول واکنش مهلر است نیز افت پیدا می‌کند. نیمه باز گذاشتن روزنه‌ها یکی از استراتژی‌های سازگاری به خشکی در گیاهانی چون لوبیا چشم بلبلی (De Carvalho et al., 1998) و لوبیا تپاری (Turkan et al., 2005) است. احتمالاً کاهش رادیکال سوپر اکسید در حالت تنش، به عنوان سیگنالی برای کاهش بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز عمل کرده است. بیشترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی، و کمترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های فوق‌الذکر در ژنوتیپ‌های حساس یا نیمه حساس به خشکی مشاهده شد. به علاوه، با تشدید سطوح خشکی فعالیت ویژه‌ی آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی پیوسته افزایش یافت، در حالی که در ژنوتیپ‌های حساس به خشکی در خشکی شدید روندی کاهش پیدا کرد. بنابراین به نظر می‌رسد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، به ویژه در شرایط خشکی، با تحمل خشکی رازیانه در مرحله‌ی گیاهچه‌ای در ارتباط است.

### نتیجه‌گیری کلی:

با استفاده از نتایج این تحقیق، ۱۲ ژنوتیپ رازیانه‌ی مورد مطالعه به سه گروه مقاوم (شیراز، یزد، کرمان و مشهد)، نیمه

### منابع:

اکرم قادری، ف.، کامکار، ب. و سلطانی، ا. (۱۳۸۷) علوم و تکنولوژی بذر. انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد.

امیرتیموری، س.، شمشادی، ک. و خلیلان، ص. (۱۳۹۰) جایگاه ایران در صادرات رازیانه: رهیافت مزیت نسبی صادراتی. فصلنامه تحقیقات اقتصاد کشاورزی ۴: ۸۳-۹۷.

حسینی، ح. و رضوانی مقدم، پ. (۱۳۸۵) اثر تنش خشکی و شوری بر جوانه زنی اسفرزه (*Plantago ovata*). پژوهش های زراعی ایران ۴: ۱۵-۲۵.

حاکشور مقدم، ز.، لاهوتی، م. و گنجعلی، ع. (۱۳۹۰) بررسی

- signaling. *Plant Signaling and Behavior* 3: 156-165.
- Chen, H. X., An, S. Z., Li, W. J., Gao, H. Y. and Zou, Q. (2004) Enhancement of the meherperoxidase reaction in salt-stressed *Rumex K-1* leaves. *Acta Botanica Sinica* 7: 811-818.
- De Carvalho, M. H. C., Laffray, D. and Louguet, P. (1998) Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* 40:197-207.
- Cheruiyot, E. K., Mumera, L. M., Ngetich, W. K., Hassanali, A. And Wachira, F. N. (2007) Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia Sinensis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 2190-2197.
- Darzi, M. T., Haj Seyed Hadi, M. R. and Yasa, N. (2005) Effects of sowing date and plant density on seed yield and quality of active substance in fennel (*Foeniculum vulgare*). *Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding* 2: 27-36.
- Farsiani, A. and Ghobadi, M. E. (2009) Effects of PEG and NaCl stress on two cultivars of corn (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stages. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 57: 382-385.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Hanselin, M. H., Eggen, T. (2005) Salinity tolerance during germination of seashore halophytes and salt tolerant grass cultivars. *Seed Science Research* 15: 43-50.
- Hashmi, N., Khan, M. M. A., Moinuddin, Idrees, M. and Aftab, T. (2012) Exogenous salicylic acid stimulates physiological and biochemical changes to improve growth, yield and active constituents of fennel essential oil. *Plant Growth Regulation* 68: 281-291.
- Hosseini, H. and Rezvani Moghadam, P. (2006) Effect of water and salinity stress in seed germination on isabgol (*Plantago ovata*). *Iranian Journal of Field Crops Research* 1: 15-22.
- Irigoyen J. J., Emerich, D. W. and Sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55-60.
- Khalid, K. A., Teixeira Da Silva, J. A. and Cai, W. (2010) Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of *Pelargonium odoratissimum* (L.). *HortScience* 125: 159-166.
- Kishor, P. B. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A. and Verma, D. P. S. (1995) Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387-1394.
- Masoumi, A., Kafi, M. and Khazaei, H. R. (2008) کافی، م.، نظامی، ا.، حسینی، ح. و معصومی، ع. (۱۳۸۴) اثرات فیزیولوژیک تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلیکول بر جوانه زنی ژنوتیپهای عدس. *مجله پژوهشهای زراعی ایران* ۱: ۸۱-۶۹.
- مرادی، ن.، ایزدی دربندی، ع.، بهمنی، ک.، فاضل نجف آبادی، م. و سادات نوری، س. ا. (۱۳۹۱) بررسی اثر تنش خشکی بر ۱۵ جمعیت رازیانه ایرانی در مرحله جوانه‌زنی. *مجموعه مقالات سومین همایش ملی علوم کشاورزی و صنایع غذایی، فسا، ایران*.
- نجف زاده اصل، س. و احسان پور، ع. ا. (۱۳۹۱) اثر تنش خشکی بر برخی از شاخص های فیزیولوژیکی دو رقم سیب‌زمینی (Concord و Kenebec) در شرایط کشت درون شیشه. *خشک بوم* ۱: ۷۰-۸۲.
- Aebi, H. E. (1983) Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer H. U.) Pp. 273-286. Weinheim, Verlag Chemie, Germany.
- Afzali, S. F., Hajabbasi, M. A., Shariatmadari, H., Razmjoo K. and Khoshgoftarmansh, H. (2006) Comparative adverse effects of Peg-OR Cl induced osmotic stress on Germination and early seedling growth of a potential medicinal plant *Matricaria Chamomilla*. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1709-1714.
- Anjumi, T. and Bajwa, R. (2005) Importance of germination indices in interpretation of allelochemical effects. *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 417-419.
- Azooz, M. M. (2009) Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Agriculture and Biology* 11: 343-350.
- Badiani, M., De Biasi, M. G., Cologna, M. and Artemi, F. (1990) Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit. *Agrochimica* 34: 90-102.
- Bates, L. S., Waldran, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water studies. *Plant and Soil* 39: 205-208.
- 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.
- Chaitanya, K. V., Sundar, D., Masilamani, S. and Ramachandra Reddy, A. (2002) Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation* 36: 175-180.
- De Carvalho, M. H. C. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and

- Quartacci, M. F. and Navari-Izzo, F. (1992) Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. *Journal of Plant Physiology* 139: 612-25.
- Singh, R. P., Murthy, K. N. C. and Jayaprakasha, G. K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 81-86.
- Soliman, W. S. and El-Shaieny, A. A. H. (2014) Effect of saline water on germination and early growth stage of five Apiaceae species. *African Journal of Agricultural Research* 7: 713-719.
- Toth, E. and Nemeth, E. (1996) Recent results in the development of genebank technologies specialised for medicinal plants. *Beitrag* 2: 72-75.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-31.
- Wang W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Deng, X. P. and Kwak, S. S. (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 570-577.
- Yagmur, M. and Kaydan, D. (2008) Alleviation of osmotic stress of water and salt in germination and seedling growth of triticale with seed priming treatments. *African Journal of Biotechnology* 7: 2156- 2162.
- Yamamoto, I., Turgeon A. J. and Duich J. M. (1997) Field emergence of solid matrix seed primed turfgrasses. *Crop Science* 37: 220-225.
- Chickpea (*Cicer arietinum* L.) germination responses to water stress induced by polyethylene glycol 6000. *Iranian Journal of Field Crops Research* 2: 453-462.
- Michel, B. E. and Kaufmann, M. R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R. and Zilinskas, B. A. (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* 5: 397-405.
- Morgan, J. M., Hare, R. A. and Fletcher R. J. (1986) Genetic variation in osmoregulation in bread and durum wheat and its relationship to grain yield in arrange of field environments. *Australian Journal of Agricultural Research* 37: 449-457.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Parida, A. K., Dagaonkar, V. S., Phalak, M. S., Umalkar, G. V. and Aurangabadkar, L. P. (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Report* 1: 37-48.
- Qayyum, A., Razzaq, A., Ahmad, M and, Jenks, M. A. (2011) Water stress causes differential effects on germination indices, total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *African Journal of Biotechnology* 10: 14038-14045.