

بررسی تأثیر اشعه ماوراء بنفش بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی رقم‌های مختلف گیاه تربچه (*Raphanus sativus* L.)

بهرخ دایی حسنی*، معصومه عابدینی، آی سان همتی و سیامک فلاحی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۷/۱۰)

چکیده:

اشعه ماوراء بنفش به عنوان یکی از عوامل مهم محیطی تنش‌زا، اثرات زیانباری بر فرایندهای فیزیولوژیکی و رشد گونه‌های گیاهی دارد. گیاهان از طریق وابستگی به سازوکارهای خاص فیزیولوژیکی با این عوامل تنش‌زا که موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن‌دار در سلول‌های گیاهی می‌شود، مقابله می‌کنند. به منظور بررسی تأثیر تنش اشعه ماوراء بنفش (UV-C) بر پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی در گیاه تربچه (*Raphanus sativus* L.) که گیاهی یک‌ساله و متعلق به تیره براسیکاسه است، صورت گرفت. این پژوهش به صورت آزمایش گلدانی در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با کشت هیدروپونیک بذرهای سه رقم مختلف گیاه تربچه (قرمز، سیاه و سفید) انجام شد. گیاهچه‌ها بعد از گذشت دو هفته، در قالب تکرارهای معین، به مدت ۱۰ روز و به مدت ۳ دقیقه/روز با دوز روزانه ۱۲ کیلوژول بر متر مربع تحت تیمار اشعه ماوراء بنفش (UV-C) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر سه رقم مورد مطالعه پرتو UV-C باعث کاهش وزن خشک ساقه و ریشه و نیز کاهش سطح برگ شد، هم‌چنین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کل)، میزان قندها و پروتئین‌های محلول کاهش یافت. میزان فنول کل، آمینواسید کل و ترکیبات جاذب UV مانند آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها در اثر تنش اشعه ماوراء بنفش (UV-C) افزایش یافتند. نتایج این تحقیق نشان داد که رقم تربچه قرمز در برابر این تنش از لحاظ تغییر در میزان متابولیت‌های سنجش شده دارای بیشترین سازگاری نسبت به دو رقم دیگر بود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین‌ها، اشعه ماوراء بنفش، پاسخ‌های فیزیولوژیکی، تربچه، تنش، فلاونوئیدها

مقدمه:

در جوامع امروزی، گسترش صنایع، زمینه افزایش ترکیبات آلوده‌کننده اتمسفر را فراهم کرده است. به دلیل پایداری زیاد، این ترکیبات به سطح استراتوسفر رسیده و باعث تخریب لایه اوزون می‌شود (Buchholz et al., 1995). نور خورشید که گیاهان از آن برای فتوسنتز استفاده می‌کنند دارای پرتوهای فرابنفش (UV-A (320-390nm)، UV-B(280-320 nm) و UV-C (< 280 nm) می‌باشد که این طیف از اشعه ماوراء بنفش در صورت کامل بودن لایه اوزون توسط استراتوسفر به صورت کامل و مؤثر جذب می‌شود. اما امروزه با کاهش ضخامت اوزون، موجودات زنده، به خصوص گیاهان پرتو فرا بنفش را دریافت کرده و در برابر آسیب جدی این پرتوها قرار می‌گیرند (Paul and Gwynn-jones, 2003). از جمله اثرات مضر این اشعه در گیاهان می‌توان به کاهش فرایند فتوسنتز از طریق

در جوامع امروزی، گسترش صنایع، زمینه افزایش ترکیبات آلوده‌کننده اتمسفر را فراهم کرده است. به دلیل پایداری زیاد، این ترکیبات به سطح استراتوسفر رسیده و باعث تخریب لایه اوزون می‌شود (Buchholz et al., 1995). نور خورشید که گیاهان از آن برای فتوسنتز استفاده می‌کنند دارای پرتوهای فرابنفش (UV-A (320-390nm)، UV-B(280-320 nm) و UV-C (< 280 nm) می‌باشد که این طیف از اشعه ماوراء بنفش در صورت کامل بودن لایه اوزون توسط استراتوسفر به صورت کامل و مؤثر جذب می‌شود. اما امروزه با کاهش ضخامت اوزون، موجودات زنده، به خصوص گیاهان پرتو فرا بنفش را دریافت کرده و در برابر آسیب جدی این پرتوها قرار می‌گیرند (Paul and Gwynn-jones, 2003). از جمله اثرات مضر این اشعه در گیاهان می‌توان به کاهش فرایند فتوسنتز از طریق

بالایی از ویتامین C و به تبع آن خاصیت آنتی اکسیدانی بالا، تربچه در درمان سرطان مؤثر است (Singh et al., 2012). هدف از این پژوهش تأثیر تابش اشعه ماوراء بنفش (UV-C) به عنوان عامل تنش زای محیطی روی برخی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی سه رقم مختلف گیاه تربچه بود.

مواد و روش‌ها:

کشت گیاهان و اعمال تیمارها: بذره‌های گیاه تربچه قرمز (*Raphanus sativus* L. cv. *sativum*)، تربچه سفید (*Raphanus sativus* L. cv. *hortensis*) و تربچه سیاه (*Raphanus sativus* L. cv. *nigra*)، پس از جوانه‌زنی به مدت یک هفته در محیط کشت هوگلند ۵۰٪ و سپس در محیط کشت هوگلند ۱۰۰٪ قرار گرفتند. رشد تحت شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۵ کیلو لوکس انجام گرفت. تنظیم حجم محلول غذایی توسط آب مقطر و pH آن روی ۵/۸ هر دو روز یک بار انجام گرفت. تعویض محلول غذایی تشتک‌ها نیز هر ۸ روز یک بار انجام شد. پس از دو هفته رشد در هوگلند ۱۰۰٪ اعمال تیمارها آغاز شد. تأمین منبع نور UV از یک عدد لامپ (UV-C) ۹۰ سانتی‌متری با طول موج ۲۵۴ نانومتر و ولتاژ ۱۰۲ ولت، توان مصرفی ۳۰ وات و جریان ۳۷۰ میلی آمپر بود. این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتور UV-C، با ۴ تکرار انجام شد. گیاهان به مدت ۲ هفته و ۳ دقیقه در روز، تحت تیمار اشعه UV-C با دوز روزانه ۱۲ کیلوژول بر متر مربع قرار گرفتند. نمونه‌ها دو هفته پس از اعمال تیمارها برداشت شدند و تا زمان سنجش پارامترهای مورد نظر در دمای ۸۰- درجه نگهداری شدند.

سنجش وزن خشک اندام هوایی و ریشه: برای اندازه

گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه به طور جداگانه به مدت ۴۸ ساعت در هاون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها، وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

ایجاد اختلال در عملکرد کمپلکس تجزیه کننده آب، تخریب فتوسیستم II، پلاستوکوئینون، کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو و ATP سنتاز و نیز تخریب رنگیزه های فتوسنتزی اشاره کرد (Lutz et al., 2005). همه موجودات زنده مکانیسم‌هایی را برای جلوگیری از ورود نور به درون سلول‌های خود دارند. همچنین پاسخ‌های ترمیمی یا سازشی به سرعت در پاسخ به قرارگیری در معرض پرتو UV القا می‌شود. مقاومت یا سازش به تنش UV در جنس‌ها، گونه‌ها و حتی بین رقم‌های گیاهی بسیار متفاوت است (Searles et al., 2001, Day et al., 1999). ساختارهایی مانند اپیدرم که معمولاً به وسیله کرک پوشیده شده است و حاوی ترکیبات جاذب UV است، نقش حفاظتی در برابر اشعه UV دارند. همچنین موم موجود در سطح اپیدرم می‌تواند تا ۸۰ درصد اشعه را منعکس سازد (Balouchi et al., 2009). ترکیبات فنیل پروپانوییدی مانند مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید و فلاونوئیدهایی مانند فلاوون‌ها، فلاونول‌ها، و نیز آنتوسیانین‌ها باعث جذب اشعه ماوراء بنفش می‌شود (Hoque and Remuss, 1999). تجمع بالای این رنگیزه‌ها در گیاهانی که در معرض این تنش واقع شده‌اند، از جمله پاسخ‌های این گیاهان در برابر این تنش محسوب می‌شود (Buer et al., 2010). همچنین نقش آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها در راستای سم زدایی گونه‌های اکسیژن فعال گزارش شده است (Hollosy, 2002). وجود آنتوسیانین‌ها در برگ‌های بالغ و همچنین در برگ‌های جوان ثابت شده است. این ترکیبات از نظر ساختمانی وابسته به فلاونوئیدها و از دسته ترکیبات فنولی گیاهان محسوب می‌شوند. نقش کلیدی آنتوسیانین‌ها در محافظت در برابر تنش اکسیداتیو ثابت شده است (Gao., 2004). مطالعات نشان داده است که آلکیل شدن آنتوسیانین‌ها و اسیدهای آلی آروماتیک باعث افزایش جذب آنها در ناحیه ۳۱۰-۳۲۰ نانومتر می‌شود (Hosseinisagheini et al., 2008). تربچه با نام علمی *Raphanus Sativus* L. گیاهی از خانواده Brassicaceae، که قسمت اصلی و خوراکی آن ریشه‌های غده مانند می‌باشد که به رنگ‌های مختلف سفید، قرمز، سیاه و دو رنگ دیده می‌شود. با توجه به دارا بودن سطح

جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن توسط اسپکتروفتومتر در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه‌ی غلظت فلاونوئیدها، از ضریب خاموشی $33000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ استفاده شد (Krizek *et al.*, 1993).

سنجش آنتوسیانین کل: برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۲ گرم از اندام هوایی گیاه در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) خوب ساییده و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتیفریژ شد. محلول رویی به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد و جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای محاسبه‌ی غلظت آنتوسیانین، از ضریب خاموشی cm^{-1} 33000 mol^{-2} استفاده شد (Masukasu *et al.*, 2003).

سنجش اسیدآمینوهای آزاد: برای سنجش غلظت کل اسید آمینوهای آزاد، نمونه‌ها در بافر فسفات پتاسیم سرد (۰/۰۵ مول و (pH=۵/۷) همگن و استخراج شده و بعد از سانتیفریژ بر روی نمونه‌های روشن‌رنگ معرف ناین‌هیدرین اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد در حمام آب قرار گرفت. پس از ۳۰ دقیقه، میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعیین شد. مقدار اسیدهای آمینو آزاد در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد گلايسين با غلظت‌های ۲۰۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شده و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر گزارش گردید (Harding and Maclean, 1916).

سنجش پرولین: برای سنجش مقدار پرولین از روش Bates (۱۹۷۳) استفاده گردید. ابتدا ۰/۲ گرم ماده‌تر گیاهی با هاون خرد شده با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ مخلوط گردید و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰۰۰g سانتیفریژ شد سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید-استیک گلايسيل خوب مخلوط شد. نمونه‌ها پس از قرارگیری در حمام آب گرم ۸۰ درجه به مدت ۱ ساعت درون یخ سرد شد. مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول لوله‌ها اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده شد. پس از اندازه

اندازه‌گیری سطح برگ: برای اندازه‌گیری سطح برگ، برگ گیاهان در مرحله چهار برگی به طور تصادفی انتخاب و جدا شد، سپس با قرار دادن قطعات بر روی کاغذ از آن‌ها کپی کاغذی تهیه گردید. ابتدا کپی مورد نظر وزن و سپس ۱ سانتی‌متر از آن جدا و سطح برگ با استفاده از یک تناسب ساده مشخص گردید.

سنجش مقدار کلروفیل و کارتنوئید: برای سنجش مقدار کلروفیل و کارتنوئید از روش (Lichtenthaler., 1987) استفاده شد. برای این منظور ۰/۲ گرم از برگ گیاه با ۱۰ سی‌سی استن ۸۰٪ در هاون ساییده شد، محتویات به یک لوله آزمایش منتقل شده و پس از ۱۰ دقیقه سانتیفریژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر جذب آنها در مقابل شاهد که حاوی استون ۸۰٪ است توسط دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو ساخت کشور ژاپن خوانده شد.

سنجش فنل کل: ۰/۲ گرم ماده گیاهی با ۲۰ میلی‌گرم متانول ۸۰٪ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام التراسونیک قرار گرفت و بعد به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ سانتیفریژ گردید. سنجش فنل کل به روش فولین‌سیوکالچئو انجام گرفت (Ronald and Lamis, 1999). برای این منظور روی ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین‌سیوکالچئو اضافه و کاملاً مخلوط شد و بعد از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر کربنات کلسیم ۷٪ به نمونه اضافه شد. جذب نمونه توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۵۰ نانومتر بعد از ۹۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت ترکیب‌های فنلی از منحنی استاندارد گالیک‌اسید با غلظت‌های ۸۰-۲۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

سنجش فلاونوئید کل: برای سنجش فلاونوئیدها ۰/۲ گرم ماده گیاهی در ۳ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (اتانول و اسید استیک به نسبت ۹۹ به ۱) خوب ساییده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتیفریژ شد. محلول رویی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. میزان

درصدی دارای بالاترین میزان کاهش در مقایسه با سایر رقم‌ها می‌باشد.

محتوای رنگ دانه‌های فتوستتزی: بررسی داده‌های (جدول ۲) حاصل از سنجش غلظت رنگدانه‌های فتوستتزی ارقام تربچه نشان داد که تیمار با UV-C باعث کاهش معنی‌دار غلظت کلروفیل a، b و کل در هر سه رقم می‌شود ($P < 0.05, n=4$). کاهش در میزان کلروفیل a در هر سه رقم بیش از ۵۰ درصد می‌باشد. کاهش در میزان کلروفیل b و کلروفیل کل در رقم سفید بیشتر از سایر رقم‌ها بوده و به بیش از ۶۰ درصد می‌رسد. بر خلاف غلظت انواع کلروفیل، اشعه UV باعث افزایش معنی‌دار کاروتنوئیدها در هر سه رقم مورد مطالعه تربچه شد که این افزایش در رقم‌های سفید و سیاه به میزان ۲/۳ برابر و در رقم قرمز حدود ۱/۳ برابر بود.

محتوای آنتوسیانین‌ها: بررسی داده‌های حاصل از سنجش محتوای آنتوسیانین رقم‌های مورد مطالعه گیاه تربچه نشان داد که تیمار با UV-C باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0.05, n=4$) محتوای آنتوسیانین در هر سه رقم می‌شود (جدول ۲). این افزایش در ارقام قرمز، سیاه و سفید به ترتیب ۲/۹، ۲/۲، و ۲ برابر میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌های شاهد گردید.

فلاونوئید برگ‌ها: نتایج حاصل از سنجش فلاونوئید در برگ گیاهچه‌ای رقم‌های مورد مطالعه نشان داد که تیمار با UV-C باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0.05, n=4$) در هر سه رقم شد. بالاترین میزان این افزایش متعلق به رقم تربچه قرمز به اندازه ۳ برابر در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد بود.

محتوای فنل کل: بررسی داده‌های حاصل از سنجش محتوای فنل کل نشان داد که تیمار با UV-C باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0.05, n=4$) مقدار فنل در هر سه رقم می‌شود (شکل ۱). بیشترین مقدار تغییرات مربوط به افزایش ۲ برابری در رقم تربچه قرمز در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد می‌باشد. با این حال، افزایش ۱/۶ و ۱/۳ برابری میزان فنل کل به ترتیب در رقم‌های تربچه سیاه و سفید قابل توجه بود.

محتوای قندهای محلول: میزان قندهای محلول در گیاهچه‌های تیمار شده با UV-C در هر سه رقم تربچه کاهش

گیری جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف پرولین رسم و معادله خط تعیین شد.

سنجش قندهای محلول: برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول، ۰/۰۱ گرم ماده‌ی خشک گیاهی در هاون چینی سائیده شد و روی آن ۱۰ میلی‌لیتر اتانل ۸۰٪ ریخته شد و به مدت یک هفته در یخچال قرار گرفت. عصاره‌ی حاصل صاف شد و روی ۰/۵ میلی‌لیتر از آن، ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه شد. بعد از نیم ساعت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت قندهای محلول با واحد $mg.g^{-1}.FW^{-1}$ از منحنی استاندارد گلوکز با غلظت‌های ۵۰-۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد (Dixon et al., 2001).

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری از برنامه Excel و نرم افزار SPSS استفاده گردید. داده‌ها از نظر آماری با آنالیز واریانس دو طرفه تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌های تمام صفات، مورد بررسی با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج:

وزن خشک و سطح برگ: تغییرات وزن خشک اندام هوایی و ریشه در ارقام تربچه به عنوان یک شاخص مهم از رشد در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، تیمار با اشعه UV-C باعث کاهش مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه شد. وزن خشک اندام هوایی گیاهان تحت تنش در رقم سیاه (Rb) در مقایسه با گیاهان شاهد ۶۳/۷ درصد کاهش نشان داد. مقدار کاهش وزن خشک در ارقام قرمز (Rr) و سفید (Rw) به ترتیب ۲۳/۶ و ۱۳/۸ درصد بود. در رقم سفید کاهش وزن خشک ریشه نسبت به گیاهان شاهد که اشعه دریافت نکرده بودند از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P < 0.05, n=4$). اما این کاهش در ارقام قرمز و سیاه تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نشان داد ($P < 0.05, n=4$). همچنین تیمار UV-C باعث کاهش سطح برگ در هر سه رقم شد که رقم سیاه با کاهش ۲۲/۸

جدول ۱- پارامترهای مربوط به وزن خشک و سطح برگ گیاه تربچه تیمار شده با اشعه ماوراء بنفش.

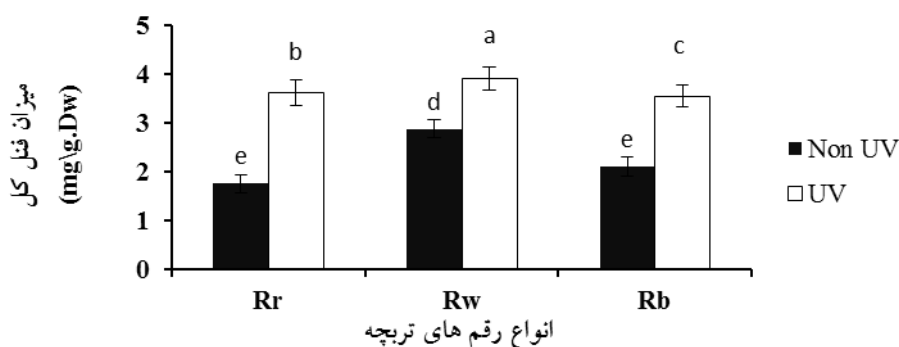
ارقام تربچه	میزان اشعه UV-C (K.J/m ²)	وزن خشک ساقه (g)	وزن خشک ریشه (g)	سطح برگ (cm ²)
Rr	۰	۰/۲۲۸±۰/۰۵۷ ^c	۰/۱۳۴±۰/۰۵۴ ^b	۱۲/۷۳±۰/۸۸ ^b
	۱۲	۰/۱۷۴±۰/۰۴۵ ^d	۰/۱۲۴±۰/۰۲۸ ^c	۱۰/۲۸±۱/۲ ^c
Rw	۰	۰/۴۳۲±۰/۰۷ ^a	۰/۱۸۲±۰/۰۱۳ ^a	۱۷/۳۷±۰/۳ ^a
	۱۲	۰/۳۷۲±۰/۰۵ ^b	۰/۱۷۶±۰/۰۷ ^a	۱۳/۹۸±۰/۵ ^b
Rb	۰	۰/۳۷۱±۰/۰۲۲ ^a	۰/۱۴۵±۰/۰۸۸ ^b	۱۴/۲۷±۰/۵۳ ^b
	۱۲	۰/۱۳۷±۰/۰۱۷ ^c	۰/۱۰۲±۰/۰۱۲ ^d	۱۱/۰۱±۰/۰۸ ^c

اختلاف بین مقادیر مربوط به هر پارامتر که دارای حروف غیر مشترک است، از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد (P < 0.05, n=4).

جدول ۲- پارامترهای مربوط به رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه تربچه تیمار شده با اشعه ماوراء بنفش.

ارقام تربچه	میزان اشعه UV-C (K.J/m ²)	کلروفیل a (mg/gFW)	کلروفیل b (mg/gFW)	کلروفیل کل (mg/gFW)	کاروتنوئید (mg/gFW)	فلاونوئید (mg/gFW)	آنتوسیانین (nmol/gFW)
Rr	۰	۴/۷۴±۰/۱۴ ^a	۷/۳۹±۰/۴۸ ^a	۱۲/۱۳±۰/۱۵ ^a	۲/۴۷±۰/۰۸ ^c	۵/۷۲±۰/۰۸ ^e	۰/۷۱±۰/۰۸۷ ^c
	۱۲	۲/۲۸±۰/۰۴ ^d	۴/۷۳±۰/۰۹ ^b	۷/۰۱±۰/۳۴ ^b	۳/۲۲±۱/۰۸ ^a	۱۷/۲۲±۰/۰۹ ^b	۲/۱۲±۰/۰۷ ^a
Rw	۰	۲/۸۷±۰/۰۷ ^c	۷/۳۶±۰/۲۸ ^a	۱۰/۲۳±۰/۴۱ ^a	۱/۱۶±۰/۰۹ ^d	۴/۲۸±۰/۳۲ ^f	۰/۳۰±۰/۰۷ ^e
	۱۲	۱/۳۰±۰/۰۱ ^e	۲/۲۹±۰/۳۴ ^d	۳/۵۹±۰/۰۲ ^c	۲/۷۴±۰/۰۲ ^b	۱۲/۰۹±۰/۰۳ ^c	۰/۶۰±۰/۰۱ ^a
Rb	۰	۳/۲۷±۰/۰۲ ^b	۳/۶۶±۰/۲۱ ^c	۶/۹۳±۰/۰۸ ^b	۱/۰۱±۰/۰۳ ^d	۶/۹۳±۰/۲۲ ^d	۰/۸۰±۰/۰۴ ^c
	۱۲	۱/۳۲±۰/۰۸ ^e	۱/۹۶±۰/۴۱ ^e	۳/۲۹±۰/۰۷ ^c	۲/۳۶±۰/۰۳ ^c	۱۸/۱۳±۰/۰۳ ^a	۱/۷۶±۰/۰۱ ^b

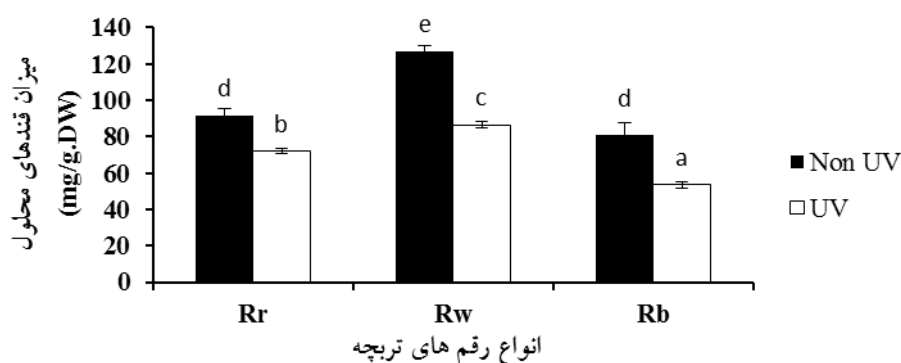
اختلاف بین مقادیر مربوط به هر پارامتر که دارای حروف غیر مشترک است، از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد (P < 0.05, n=4).



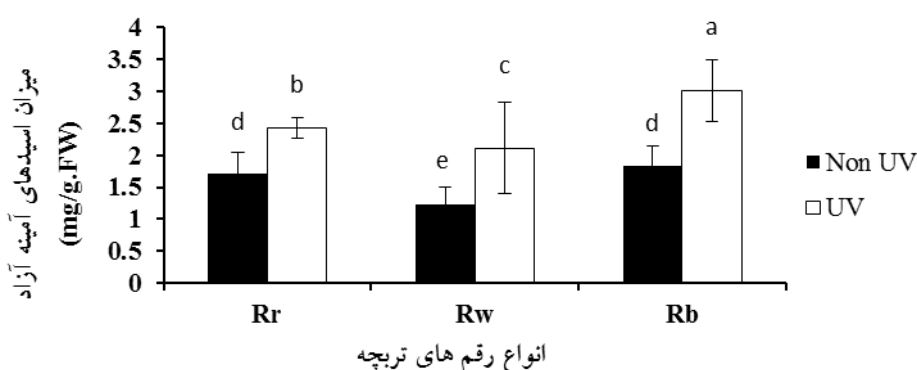
شکل ۱- تأثیر تیمار اشعه‌ی ماوراء بنفش بر مقدار فنل کل. در ارقام تربچه. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیر مشترک هستند، از لحاظ آماری نسبت به یکدیگر معنی دار می‌باشند (P < 0.05, n=4).

محتوای آمینواسیدهای آزاد: تیمار گیاهچه‌های تربچه با اشعه UV-C منجر به افزایش معنی‌دار (p < 0.05, n=4) میزان آمینواسیدهای آزاد در هر سه رقم مورد مطالعه نسبت به گیاهان شاهد شد. این افزایش در رقم تربچه قرمز، سیاه و سفید نسبت

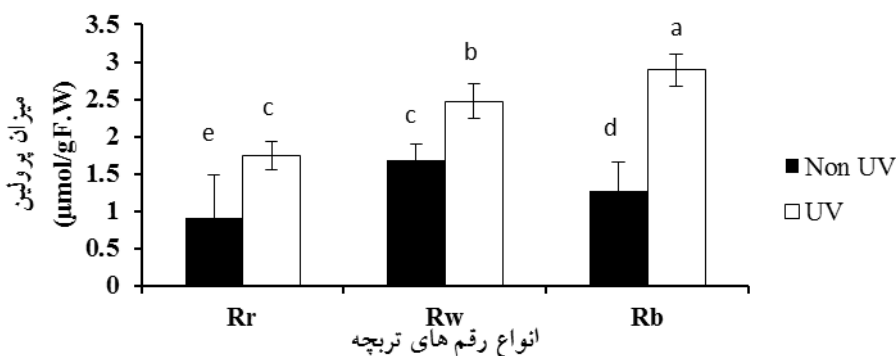
معنی‌داری (p < 0/05, n=4) را نشان داد (شکل ۲). میزان قندهای محلول در گیاهچه‌های رقم سیاه و سفید حدود ۳۰ درصد و در رقم قرمز حدود ۲۰ درصد در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد کاهش یافت.



شکل ۲- تأثیر تیمار اشعه‌ی ماوراءبنفش بر مقدار قند محلول. در ارقام تربچه. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک هستند، از لحاظ آماری نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$, $n=4$).



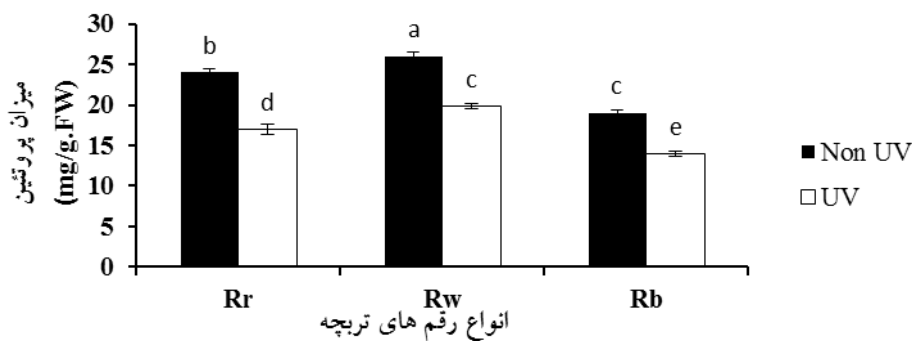
شکل ۳- تأثیر تیمار اشعه‌ی ماوراءبنفش بر مقدار اسیدآمین‌آزاد در ارقام تربچه. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک هستند، از لحاظ آماری نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$, $n=4$).



شکل ۴- تأثیر تیمار اشعه‌ی ماوراءبنفش بر مقدار پرولین در ارقام تربچه. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک هستند، از لحاظ آماری نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$, $n=4$).

میزان ۲/۲ برابر دارای بیشترین میزان تجمع پرولین در مقایسه با دو رقم دیگر در شرایط تیمار شده بود. گیاهچه‌های تیمار شده رقم‌های قرمز و سفید به ترتیب افزایش ۱/۹ و ۱/۴ برابری در میزان پرولین در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد را نشان دادند. محتوای پروتئین کل: بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری

به گیاهان شاهد به ترتیب ۱/۴، ۱/۶ و ۱/۷ برابر بود (شکل ۳). محتوای پرولین: افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$, $n=4$) تجمع پرولین در گیاهچه‌های تحت تیمار UV-C در هر سه رقم تربچه در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد مشاهده شد. (شکل ۴). افزایش محتوای پرولین در گیاهچه‌های تیمار شده رقم سیاه به



شکل ۵- تأثیر تیمار اشعه‌ی ماوراءبنفش بر مقدار پروتئین کل در ارقام تربچه. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک هستند، از لحاظ آماری نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$, $n=4$).

تیمار UV می‌باشد (Buer *et al.*, 2010). مطالعات انجام گرفته توسط محققین دیگر در بیشتر موارد حاکی از کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان تحت تیمار اشعه‌ی UV می‌باشد، برای مثال کاهش این رنگیزه‌ها در گیاهانی مانند بارهنگ، پنیرک و *Simbrium crysimoids* (Salama *et al.*, 2010) و *B. napus* (Nasibi *et al.*, 2005) نیز گزارش شده است. تأثیر اشعه‌ی UV در افزایش محتوای کاروتنوئید در اغلب گیاهان به اثبات رسیده است که در ارتباط با نقش آن در حفاظت از ساختارهای فتوسنتزی در برابر اثرات مضر این اشعه می‌باشد (Salama *et al.*, 2010, Prado *et al.*, 2012, Piri *et al.*, 2011). به‌طور کلی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشانی از سطح مقاومت گیاه در برابر اشعه UV می‌باشد که می‌تواند فتوسنتز را تحت تأثیر قرار دهد (Nasser, 2001).

محتوای فلاونوئید و آنتوسیانین‌ها: در بررسی حاضر محتوای فلاونوئید و آنتوسیانین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. افزایش ترکیبات فنلی جذب‌کننده اشعه UV در پاسخ به تنش ناشی از این اشعه یک پاسخ شناخته شده در گیاهان می‌باشد که در گستره وسیعی از گیاهان مشاهده شده است (Smith *et al.*, 2000, Sreevidya *et al.*, 2006, Savirnata *et al.*, 2010). در گیاهان تولید آنتوسیانین تحت تأثیر متقابل عوامل داخلی و خارجی مانند نور، دما، کربوهیدرات، هورمون‌های گیاهی و تنش آبی می‌باشد. این عوامل اکثراً از طریق تأثیر بر فاکتورهای رونویسی بر میزان آنتوسیانین تأثیر می‌گذارند (Kim *et al.*, 2006). افزایش آنتوسیانین در گیاه

پروتئین کل نشان داد که پرتوهای UV-C باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$, $n=4$) این شاخص نسبت به گیاهان شاهد شد. این کاهش در رقم تربچه‌های قرمز، سیاه و سفید به ترتیب ۲۹/۱ درصد، ۲۶/۳ درصد و ۲۳/۸ درصد در مقایسه با گیاهان شاهد بود (شکل ۵).

بحث:

پارامترهای مربوط به رشد: در این تحقیق تیمار UV-C باعث کاهش معنی‌دار در رشد و همچنین کاهش در مقدار وزن خشک گیاهان شد. در گیاهانی مانند پنبه (Kakani, 2003) و گیاه فاگوپیروم تارتاریکو (Yao *et al.*, 2006 & 2014) کاهش رشد و ارتفاع گیاه در اثر UV گزارش شده است. در لوبیا و جو وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی تحت تابش UV کاهش می‌یابد (Ambasht and Agrawal, 1998). کاهش سطح برگ در اثر مواجهه با اشعه ماوراء بنفش در گیاهان مختلف مانند گندم، برنج، ذرت، آفتابگردان، چاودار، خیار، پنبه، نخود، کدو و سویا (Yao 2006 & 2014, Nagues 1998, Kakani 1998, Ambasht 2003) گزارش شده است که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مبنی بر کاهش سطح برگ مشابه است.

محتوای رنگ دانه‌های فتوسنتزی: طبق نتایج بدست آمده اثر UV-C بر محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید گیاهان معنی‌دار بود و موجب کاهش کلروفیل a و b و افزایش کاروتنوئید در گیاهان گردید. این نتایج مشابه با کاهش مشاهده شده در سطح رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ‌های فلغل قلمی تحت

محتوای قندهای محلول تحت تأثیر پرتوهای ماوراء بنفش در گیاه فلفل توسط گزارش شده است (Hosseini, 2008). کاهش میزان قند در تیمارهای UV-C نشان دهنده کاهش فتوستتیز است و این کاهش فتوستتیز به دلایلی از جمله پراکسیداسیون غشای تیلاکوئیدی، جذب UV توسط فتوسیستم II، تخریب پروتئین‌های D1 و D2 و تخریب آنزیم روبیسکو رخ می‌دهد (Ambasht and Agrawal, 1998). علاوه بر نقش مستقیم تنش UV در کاهش بیوستتیز قندها گزارش شده است که تنش اکسیداتیو القاء شده توسط این اشعه از طریق تخریب درشت مولکول‌های زیستی مثل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و کربوهیدرات‌ها باعث کاهش آنها می‌شود (Salama et al., 2011). علاوه بر این کاهش مقدار قندهای محلول در برگ‌های بعضی از ارقام گندم، ذرت و پنبه تحت تیمار با UV نیز گزارش شده است (Kakani, 2003, Salama et al., 2011, An et al., 2000, Tossi et al., 2009).

محتوای آمینواسیدهای آزاد و پرولین: بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت پرولین و آمینواسیدهای آزاد در ارقام تربچه نشان داد که پرتوی UV-C باعث افزایش غلظت پرولین و آمینواسیدهای آزاد می‌شود. اسیدهای آمینه از طریق تقویت دیواره سلولی، افزایش تولید لیگنین و ترمیم سریعتر بافت‌های آسیب دیده موجب افزایش مقاومت گیاه در برابر آفات و تنش‌ها می‌گردند (Bates et al., 1973). یکی از مهمترین اسیدهای آمینه آزاد پرولین می‌باشد. پرولین تجمع یافته نقش‌هایی مانند ایجاد ترکیب اسمزی، ترکیب ذخیره‌ای ازت، جاروب‌کننده رادیکال‌های هیدروکسیل، تنظیم پتانسیل اکسیداسیون سلولی، تنظیم pH و حفظ تورژسانس و حجم سلول را به‌عهده دارد که در نهایت موجب سازش و تحمل در برابر تنش می‌شود (Hua et al., 1997). در آزمایشی بیان شده است که با افزایش اشعه‌ی ماوراء بنفش مقدار پرولین افزایش می‌یابد که این افزایش می‌تواند به علت تحریک ساخت پرولین از گلوتامیک اسید، جلوگیری از اکسیداسیون پرولین و بازدارندگی متابولیسم پرولین باشد (Funck et al., 2009). تغییر محتوای پرولین یکی از رایج‌ترین پاسخ‌هایی است که به

فلفل قلمی (Ambasht and Arawal, 1998) و جوانه‌های گیاه تربچه (Singh et al., 2012) نیز گزارش شده است. ترکیبات جذب‌کننده UV که اغلب فلاونوئیدها یا مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید مثل آنتوسیانین هستند، می‌توانند در اپیدرم و در واکوئل تجمع یابند و یا به‌صورت باند به دیواره یا کوتیکول قرار بگیرند که تجمع آنها نوعی مکانیسم حفاظتی برای جلوگیری از نفوذ پرتوهای ماوراء بنفش است (Krizek et al., 1997). نقش این ترکیبات در تحقیقاتی که Li و همکاران (۱۹۹۳) انجام داده‌اند، مشخص شده است. به‌طوری که جهش یافته‌های آرایبدوپسیس که قدرت ساختن فلاونوئید را ندارند نسبت به نوع وحشی از حساسیت زیادی در برابر تابش اشعه ماوراء بنفش دارند. مطالعات نشان می‌دهد که پرتوهای ماوراء بنفش باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمینولیز می‌شوند و در نتیجه باعث تولید سینامیک‌اسید و فعال شدن مسیر بیوستتیز فلاونوئیدها می‌شود. افزایش در غلظت فلاونوئیدها ناشی از فعالیت زیاد آنزیم فنیل آلانین آمینولیز و یا سرعت بالای سنتز این آنزیم گزارش شده است (Liu et al., 2012). گزارش‌ها نشان می‌دهند که مقدار و فعالیت آنزیم کالکون سنتاز که نقش اساسی در بیوستتیز فلاونوئیدها دارد، تحت تأثیر پرتوهای ماوراء بنفش افزایش می‌یابد (Li et al., 2012). آنتوسیانین‌ها از ترکیبات فنولی مشتق شده از مسیر بیوستتیز فلاونوئیدها هستند که خاصیت فیلتر کردن پرتوهای UV را دارند (Gould et al., 2009). افزایش میزان آنتوسیانین‌ها تحت تنش UV ناشی از تحریک بیان ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستتیز این ترکیبات است. اثر شدت‌ها و زمان‌های مختلف پرتو UV-C بر افزایش میزان آنتوسیانین در گیاه توت فرنگی گزارش شده است (Hosseini et al., 2008). به‌طور کلی آنتوسیانین‌ها به‌عنوان جاذب پرتوهای ماوراء بنفش در اپیدرم عمل کرده و بافت‌های گیاهی را از صدمات ناشی از این پرتوها محافظت می‌کنند (Gould et al., 2009).

قندهای محلول: نتایج حاصل از بررسی غلظت قندهای محلول تحت تابش UV-C نشان داد که این پرتو باعث کاهش معنی‌دار سطح قندهای محلول در اندام هوایی می‌شود. کاهش

بیشیمیایی تربچه نشان داد که پرتو UV-C باعث وارد آمدن آسیب شدید به این گیاه می‌شود. افزایش میزان ترکیبات جاذب UV مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها که مکانیسم دفاعی در برابر تابش پرتوهای ماوراءبنفش هستند، مشاهده گردید. همچنین این تحقیق نشان داد که رقم تربچه قرمز از لحاظ تغییر در میزان متابولیت‌های سنجش شده دارای سازگاری بیشتری نسبت به دو رقم دیگر مورد مطالعه است.

وسيله تنش در گیاهان القا می‌شود و در سازوکارهای بردباری به تنش دخیل می‌باشد (Mohammadkhan and Heidari, 2008). تجمع پرولین موجب کاهش آسیب به غشاء و پروتئین‌ها می‌گردد. پرولین علاوه بر تنظیم اسمزی، منبع کربن و نیتروژن احیاء شده نیز محسوب می‌گردد (Funck et al., 2009).

نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های فیزیولوژیکی و

منابع:

- Ambasht, N. K. and Agrawal, M. (1998) Physiological and biochemical responses of *Sorghum vulgare* plants to supplemental ultraviolet-B radiation. *Canadian Journal of Botany* 76: 1290-1294.
- An, L. Feng, H., Tang, X. and Wang, X. (2000) Changes of microsomal membrane properties in spring wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) Exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57: 60-65.
- Balouchi, H. R., Sanavy, S. A. M., Emam, Y. and Dolatabadian, A. (2009) UV radiation, elevated CO₂ and water stress effect on growth and photosignaling. *Plant Growth Regulation* 26:290-300.
- Bates, L. S., Walderen, R. D. and Taere, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Buchholz, G., Ehmann, B. and Wellman, E. (1995) Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolysis formation in mustard cotyledons (*Synapis alba* L.). *Plant Physiology* 108:227-234.
- Buer, C. S., Imin, N. and Djordjevic, M. A. (2010) Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 98-111.
- Day, T. A., Ruhland, C. T., Grobe, C.W. and Xiong, F. (1999) Growth and reproduction of Antractic vascular plants in response to warming and UV radiation reductions in the field. *Oecologia* 119:24-35.
- Dixon, P., Weinig, C. and Schmitt, J. (2001) Susceptibility to UV Damage in *Impatiens capensis* (*Balsaminaceae*): Testing for Opportunity Costs to Shade-Avoidance and Population Differentiation. *American Journal of Botany* 88:1401-1408.
- Funck D., Stadelhofer B. and Koch W. (2009) Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology* 8: 40-45.
- Gao, W. (2004) Effects of supplementary ultraviolet-B irradiance on maize yield and qualities: a field experiment. *Photochemistry and Photobiology* 80: 127-1231.
- Gould, K., Davies, K. M. and Winefield, C. (2008) Anthocyanin, Biosynthesis, Functions, and Applications. 1-3:117-231.
- Hollosy, F. (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
- Hoque, E. and Remus, G. (1999) Natural UV-screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* L. karts) needles. *Photochemistry and Photobiology* 69:177-192.
- Hrding, V. J and Maclean, R. M. (1916) The ninhydrin reaction with amines and amides. *Journal of Biological Chemistry* 25: 337-350.
- Hosseini sarghein, S., Carapetian, J. and Khara, J. (2008) Effects of UV radiation on photosynthetic pigments and UV-A absorbing compounds in *Capsicum longum* L. *International Journal of Botany* 4:486-490.
- Hua, X. J., Van de Cotte, B., Montagu, M. V. and Verbruggen, N. (1997) Developmental regulation of proline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114: 1215-1224.
- Kakani, V. G., (2003) Effects of Ultraviolet-B Radiation on Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Morphology and Anatomy. *Annals of Botany* 91: 817-826
- Kim, J. S., Lee, B. H., Kim, S. H., Ok, K. H. and Cho, K. Y. (2006) Response to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in non chlorophyllous corn (*Zea mays* L.) leaf. *Journal of Plant Biology* 49: 16-25.
- Krizek, D. T., Kramer, G. F., Upadyaya, A. and Mirecki, R. M. (1993) UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Plant Physiology* 88: 350 – 358.
- Krizek, D. T., Karmer G. F, Mirecki R. M. (1997) Influence of UV-B radiation and putrescine on shoot and root growth of cucumber seedlings grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition* 20: 613-623z.

- Lichtenthaler, H. K. (1978) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Liu, M. (2012) Responses of the flavonoid pathway to UV radiation stress and the correlation with the lipid antioxidant characteristics in the desert plant *Caryopteris mongolica*. *Acta Ecologica Sinica*. 32: 150-155.
- Lutz, C., Schonauer, E. and Neuner, G. (2005) Physiological adaption to early spring conditions in green overwintering leaves of some alpine plants. *Phyton* 45:139-156.
- Martens, S. and Mithofer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66: 2399–2407.
- Masukasu, H., Karin, O. and Kyoto, H. (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science* 164: 2: 259 - 265.
- Mohammadkhani, N. and Heidari, R. (2008) Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal* 3: 448-453.
- Nasibi, f. and Kalantari, K. M. (2005) The effects of uv-a, uv-b and uv-c on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *brassica napus*. *Iranian Journal of Science and Technology Transaction a- Science* 29: 39-48.
- Nasser, L. E.-A.A. (2001) Effects of UV radiation on some physiological and biochemical aspects in two cultivars of barley (*Hordeum vulgare L.*). *Egyptian Journal of Biology* 3:95-107
- Nogués, S. (1998) Ultraviolet-B Radiation Effects on Water Relations, Leaf Development, and Photosynthesis in Droughted Pea Plants. *Plant Physiology* 117: 173-181.
- Paul, N. D. and Gwynn-jones, D. (2003) Ecological roles of solar ultraviolet radiation: towards as integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution* 18:48-55.
- Piri I, E., Babaeian, M., Tavassoli, A. and Esmaeilian, Y. (2011) Effects of UV irradiation on plants. *African Journal of Microbiology Research* 5: 1710-1716.
- Prado, F. E., Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J. A. and Hilal, M. (2012) UV-B Radiation, Its Effects and Defense Mechanism in Terrestrial Plants. In: *Environmental Adaption and Stress Tolerance of Plants in Era of Climate Change*. Ahmad P y Prasad M N V. ISBN: 978-1-4614-0814-7.
- Ronald, S. F. and Laima S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Salama, H. M. H., Watban, A. A. Al. and Al-Fughom, A. T. (2011) Effect of ultraviolet radiation on chlorophyll, carotenoid, protein and proline contents of some annual desert plants. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 79-86.
- Savirnat, N. M., Jukunen-Titto R., Oksanen, E. and karjalainen, R. O. (2010) Leaf phenolic compounds in red clover (*Trifolium Pratense L.*) induced by exposure to moderately elevated ozone. *Environmental Pollution* 158(2): 440-446.
- Searles, P. S., Flint, S. D. and Caldwell M. M. (2001) A metaanalysis of plant field studies simulatingstratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127:1-10.
- Singh, S., Kumari, R., Agrawal, M and Bhushan, A. S. (2012) Differential Response of Radish Plant to Supplemental Ultraviolet-B Radiation under Varying NPK Levels: Chlorophyll Fluorescence, Gas Exchange and Antioxidants. *Physiologia Plantarum* 145:474-484.
- Smith, J. L., Burrirt D. J. and Bannister, P. (2000) Shoot Dry Weight, Chlorophyll and UV -absorbing Compounds as Indicators of a Plant's Sensitivity to UV Radiation. *Annals of Botany* 86: 1057-1063.
- Sreevidya, V. S., Srinivasa R. C., Rao, C., Sullia, S. B., Ladha, J. K. and Reddy, P. M. (2006) Metabolic engineering of rice with soyabean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *Journal of Experimental Botany* 57: 1957-1969.
- Tossi, V., Lamattina, L. and Cassia, R. (2009) An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *The New phytologist* 181: 871-879.
- Yao, X. (2014) Grain yield, starch, protein, and nutritional element concentrations of winter wheat exposed to enhanced UV-B during different growth stages. *Journal of Cereal Science* 60: 31-36.
- Yao, Y. (2006) Effects of ultraviolet-B radiation on crop growth, development, yield and leaf pigment concentration of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under field conditions. *European Journal of Agronomy* 25: 215-222.