

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

شکیبا عزیزیگی<sup>۱</sup> و جلیل خارا<sup>۱\*</sup>

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 کاروتونوئید 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 آللوباتیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاهان را کاهش داد.

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

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

مقدمه:

آلوباتی (دگرآسیبی) به هر گونه اثر مستقیم یا غیر مستقیم تحریک کنندگی یا بازدارنده‌گی 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 آللوباتی اولین بار توسط دانشمند آلمانی، مولیچ در سال ۱۹۳۷ مطرح شد.

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

mekanizm 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 قارچ‌ها میکوریز پرسود را قطع می‌کند (Allen, 1980). گزارش‌ها نشان می‌دهند که اکثر گونه‌های بیگانه کمترین وابستگی را به قارچ‌های میکوریز دارند (Pendleton 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 کاروتئین 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 تأثیر 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 آسکوربیات پراکسیداز در

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 دانه گرده، جذب مواد غذایی، فتوسترن، تنفس، نفوذپذیری غشا، نمو ریشه، فعالیت آنزیم‌ها و همچنین بر برخی ویژگی‌های اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی همچون تأثیر بر توالی گیاهی، ساختار جامعه گیاهی، غالیت، گوناگونی، تثیت 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 کمزنگ 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-۱۰-فنتاکوئینون) که بسیار سمی است اکسیده می‌شود (Rietveld, 1983). ریزش برگ‌ها در پاییز یا شسته شدن ژوگلان با آب باران باعث می‌شود گیاهان نزدیک به سایه انداز درخت گردو آسیب بینند. 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، لویا، ذرت، پیاز، هویج، کدو، گیلاس، بنفشه، یاس، افاقیا، 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).

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 رسنه‌ها، وزیکولها و آربوسکولها، اسپورهای قارچ و قطعات ریز ماسه چسبیده به آنها بود.

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 آلوپاتیک می‌باشد، افزایش معنی داری نسبت به گیاهان شاهد پیدا می‌کند (امیدپناه و همکاران، ۲۰۱۰). هدف از این تحقیق ارزیابی تاثیر آلوپاتیک عصاره آبی برگ گردو بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان جعفری تحت همزیستی قارچ میکوریز *Glomus versiforme* می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها:

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. بذرهای جعفری با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدغفوئی شد. درون هر گلدان مخلوط خاک و ماسه ۳۰۰ شسته و استریل شده با نسبت ۱:۵ ریخته شد. حدود ۵۰ 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 اتفاقک‌های رشد با دمای شباهنروزی ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۷۰ درصد و طول دوره روشنایی ۱۴ ساعت انتقال داده شدند. طول دوره رشد ۴۵ روز در نظر گرفته شد که طی این مدت گلدان‌ها با محلول غذایی نیم قدرت هوگلنده 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 یافته تر برگ‌ها توزین شد و با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ له گردید، با تنظیف 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

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 سانتریگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و توسط آسیاب برقی پودر شدند. سپس ۱۰ گرم پودر خشک در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. عصاره حاصل از پارچه تنظیف 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 فوکانی 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 اسپورهای 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. بذرهای ذرت پس از ضدغفوئی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، با آب مقطر شسته شدند. شرایط محیطی اتفاق کشت به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای شب و روز به ترتیب ۲۰ و ۳۲ درجه سانتریگراد در نظر گرفته شد. تمام گلдан‌ها پس از هفته سوم با استفاده از محلول غذایی Rorison تغذیه شدند.

شد و سپس جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر 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 میلی لیتر بافر شامل (باfr تریس- $\text{HCl}$ , ۰/۰۵ مولار با  $\text{MgCl}_2$ , ۷/۵ pH) مولار، EDTA (۱ میلی مولار) با دسته هاون ساییده شد. بافر استخراجی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(APX) شامل ۰/۲ میلی مولار 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 آنتی‌اکسیدان استفاده گردید. فعالیت آنزیم APX با استفاده از روش Asada (۱۹۹۲) اندازه‌گیری شد. روی ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷ (شامل ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات سدیم ۰/۰۵ میلی مولار، ۰/۲ میلی لیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) میلی لیتر آنزیم استخراجی اضافه شد سپس فعالیت آنزیم از طریق اکسید شدن آسکوربات توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تعیین فعالیت گایاکول پراکسیداز(GPX) با استفاده از روش Upadhyaya و Sankhla (۱۹۸۵) انجام گرفت. روی ۰/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۱ میلی لیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۰/۱٪، ۱ میلی لیتر گایاکول ۰/۳٪ و ۰/۳ میلی لیتر عصاره‌ی آنزیم استخراجی افزوده شده و فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفوتومتر 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 فتوستزی:** با افزایش غلاظت ماده آللوپات عصاره، محتوای کلروفیل a و b هم در گیاهان غیرمیکوریزی و هم در گیاهان تلچیق شده با قارچ

اسپکتروفوتومتر 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 همچنین کاروتنوئید کل از فرمول Lichtenthaler (Wellburn ۱۹۸۵) استفاده گردید.

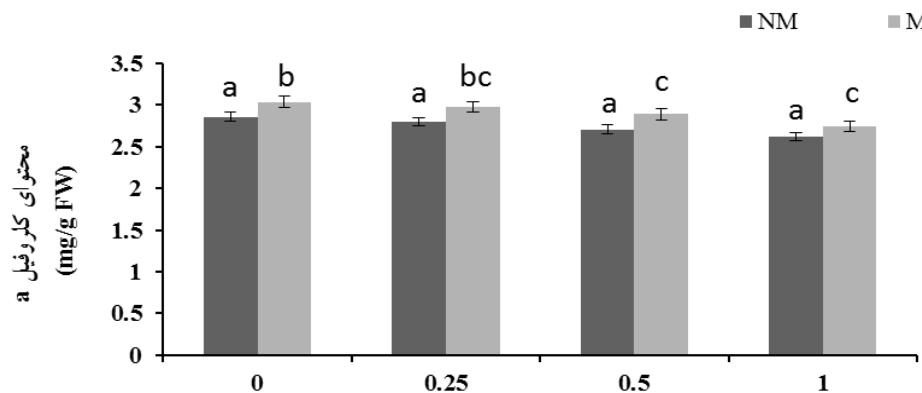
$$\text{Chl}_a = 12/25 \text{ A}_{663} - 2/79 \text{ A}_{646}$$

$$\text{Chl}_b = 21/5 \text{ A}_{646} - 5/1 \text{ A}_{663}$$

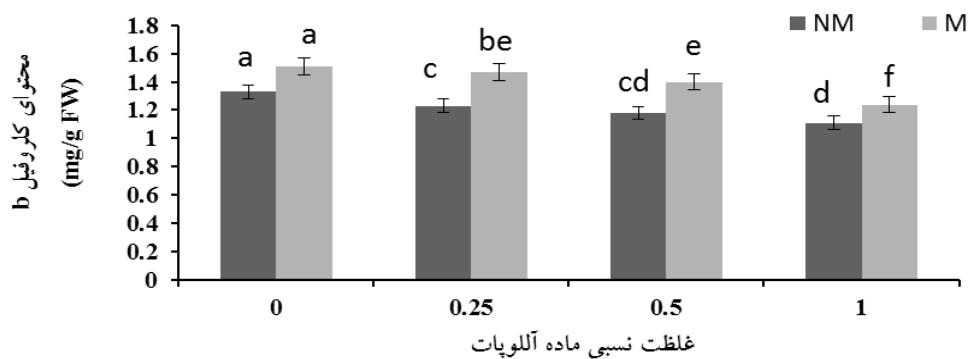
$$\text{C}_{x+c} = (1000 \text{ A}_{470} - 1/82 \text{ Chl}_a - 85/02 \text{ Chl}_b) / 198$$

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 اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان پروتئین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ۰/۵ گرم بافت تر برگ همراه با ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد ساییده شد. به ۲ میلی لیتر از عصاره تهیه شده، ۲ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی لیتر 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 میلی لیتر تولوئن به آن اضافه گردید. میزان جذب فاز رویی با استفاده از اسپکتروفوتومتر 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 میلی لیتر اتانول ۱۰ درصد ساییده شده و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از صاف نمودن هموژنات با کاغذ صافی، برای تعیین اسیدهای آمینه آزاد به ۰/۱ میلی لیتر از عصاره صاف شده ۱ میلی لیتر بافر استیک اسید-استات سدیم، ۳ میلی لیتر معرف نین‌هیدرین و ۰/۱ میلی لیتر 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 میلی لیتر رسانده



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).

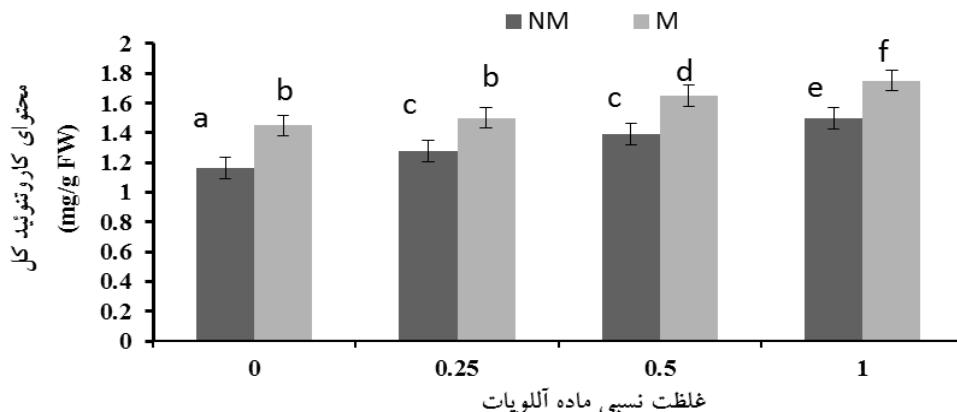


شکل ۲- تغییرات محتوای کلروفیل b در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

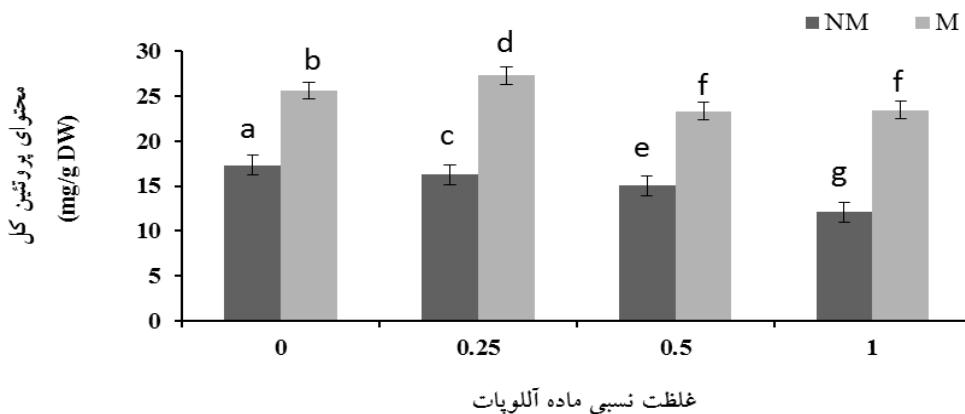
گیاهان همزیست با قارچ *G.versiforme*, در غلظت یک چهارم واحد افزایش و سپس در غلظت‌های نیم و یک واحد کاهش می‌یابد. اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز از محتوای پروتئین بیشتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار بودند (شکل ۴). محتوای پروولین و آمینواسیدهای آزاد در گیاهان تلقیح شده و گیاهان غیرمیکوریزی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

**آنژیم‌های آنتی‌اکسیدانت:** فعالیت آنژیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به عنوان آنژیم‌های آنتی‌اکسیدان دخیل در ایجاد مقاومت در قبال

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 ۱ و ۲). با افزایش عصاره، محتوای کاروتونوئید کل در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی افزایش یافت همچنین بین گیاهان شاهد و گیاهان همزیست با قارچ *G.versiforme* اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۳). پروتئین کل، پروولین و آمینواسیدهای آزاد: با افزایش غلظت ماده آللوباتیک، محتوای پروتئین کل اندام هوایی، در



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



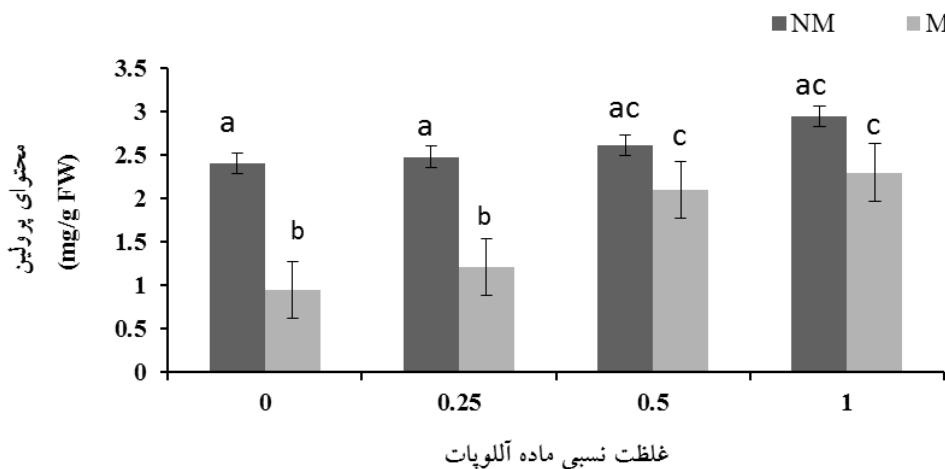
شکل ۴- تغییرات محتوای پروتئین کل اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غله‌زنی‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

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

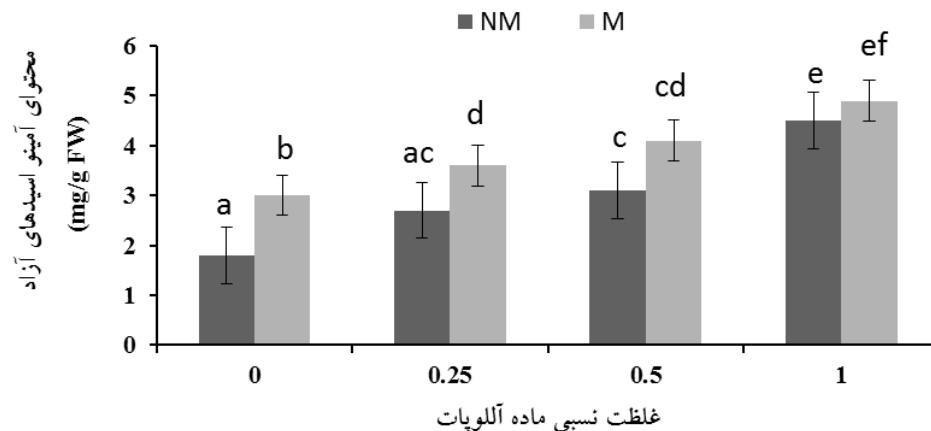
تشهای محیطی اهمیت دارند. نتایج حاصل از بررسی فعالیت این آنزیم‌ها در اندام هوایی گیاهان میکوریزی و غیر میکوریزی، تحت غله‌زنی‌های مختلف ماده آللوپات در شکل‌های ۷ و ۸ آورده شده است. مطابق نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های مربوطه، با افزایش عصاره‌ی آبی برگ گردو فعالیت آنزیم‌های APX و GPX در اندام هوایی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

#### بحث:

**رنگدانه‌ای فتوسترنی:** نتایج آزمایش‌ها نشان داد که تیمارهای میکوریزی دارای محتوای رنگدانه‌ای فتوسترنی بالاتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی می‌باشند. بالا بودن



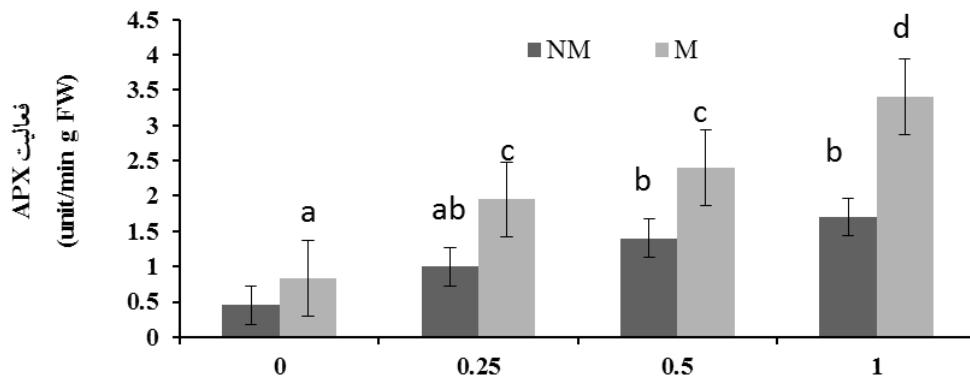
شکل ۵- تغییرات محتوای پرولین کل اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند).



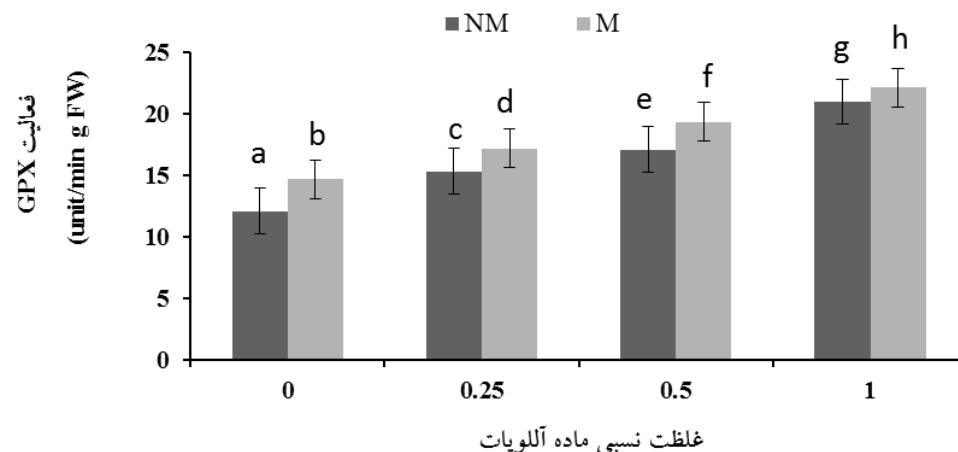
شکل ۶- تغییرات محتوای آمینو اسیدهای آزاد در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غلظت‌های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند).

به دگرآسانی، مهار رشد گیاهان در معرض مواد آللوشیمیایی با کاهش کلروفیل در آنها همراه بوده است. ممکن است این کاهش کلروفیل یک اثر ثانویه ناشی از عملکرد مواد آللوشیمیایی ویژه باشد (Babu and Kandasamy, 1997). کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند بر اثر افزایش فرایندهای متابولیک مربوط به سنتز رنگدانه‌های فتوستترزی جدید باشد. علاوه بر این، کاهش کلروفیل ممکن است مربوط به آسیب‌هایی باشد که به سیستم‌های فتوستترزی وارد آمده است (Al-Juboory 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 اسنس برگ گیاه *Eucalyptus globulus* میزان کلروفیل گیاهان *Phaseolus saureus* و *Lens esculentum* است (Kohli and Singh, 1991). طیف وسیعی از مواد آللوشیمیایی قادرند با تغییر مقدار کلروفیل، فرایند فتوستترز گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند. در بیشتر گزارش‌های مربوط



شکل ۷- تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(APX) اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غله‌ت های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۰.۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند).



شکل ۸- تغییرات فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز(GPX) اندام هوایی در گیاهان جعفری غیرمیکوریزی (NM) و میکوریزی (M) تحت غله‌ت های مختلف عصاره برگ گردو. داده‌ها، نشانگر میانگین سه تکرار است. (ستون های دارای حروف مشابه در سطح ۰.۵٪ از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارند).

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

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

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

همچنین، Nemec و Meredith (۱۹۸۱) نشان داده‌اند که مقدار کل اسیدآمینه 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 حذف کننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز، ترکیبات سمیت‌زدا در برابر لیپوکسیژنازها (گلوتاتیون-S-ترنسفراز و آسکوربات پراکسیداز) و شبکه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های کم وزن (آسکوربات، گلوتاتیون، ترکیبات فلی و توکوفرولوها) هستند (Bolkhina *et al.*, 2003). آنزیم گایاکول پراکسیداز از آنزیم‌هایی است که پراکسید هیدروژن تولید شده طی تنش‌های اکسیداتیو را از طریق گلوتاتیون احیایی کاهش می‌دهد (Bolkhina *et al.*, 2003).

تحقیق‌ها نشان داده‌اند که مواد آللوپاتیک علاوه بر جوانه‌زنی و رشد بر فرایندهای متابولیک نظیر تنفس، فتوستتر 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 آنتی‌اکسیدان 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 انسانس برگ

چهارم واحد عصاره برگ گردو محتوای پروتئین کل را افزایش و سپس غلط‌های 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 پروتئین و آمینواسیدهای آزاد در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی، همراه با افزایش غلط 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 گلوكوزینولات 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 بیوستتر پروتئین می‌باشد. در بررسی حاضر به نظر می‌رسد افزایش تولید گلوتامات در اثر پیری القا شده، منجر به افزایش محتوای پروتئین در برگ‌های جعفری شده است. به علاوه، تخریب پروتئین باعث تولید پروتئین، 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 غلط‌های ۰/۵ و ۱/۵ درصد بیشترین کاهش را در محتوای پروتئین برگ‌های کلزا موجب می‌شود. در تمام تیمارها، افزایش محتوای پروتئین 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 غلط‌ت بالایی از پروتئین را در اندام های هوایی و ریشه خود حفظ کند. افزایش ۱۷ درصدی غلط پروتئین با حضور میکوریز در گیاه شبدر توسط Arienes و همکاران (۱۹۹۳) گزارش شده است.

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 آگشتگی میکوریزی حمایت می‌کند. عصاره برگ *Populus tremuloides* L. برای بسیاری از قارچ‌های میکوریز سمی بوده است (Olsen *et al.*, 1971) و عصاره *Rubus idaeus* L. رشد ۵ گونه از قارچ‌های اکتوامیکوریز را کاهش می‌دهد؛ در حالی که محرك 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 طوری که 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 مرتب 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.

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 اکالیپتوس با اثر آللوپاتی باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربیات 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 GPX و APX در اندام هوایی گیاهان شاهد و میکوریزی افزایش می‌باشد. رابطه مقابله آللوپات و کلونی‌های میکوریزی: گزارش‌ها نشان می‌دهند که اکثر گونه‌های گیاهی بیگانه در جوامع بومی کمترین وابستگی افزایش می‌باشد. (Pendleton and Smith, 1983) میکوریزی دارند (Reeves *et al.*, 1990) دریافتند که در مراتعی در کالیفرنیا که مورد هجوم گیاهان بیگانه واقع شده بودند، نشانه‌های کاهش حضور کلونی‌های قارچ AM نسبت به مناطق مجاور دیده شوند (2005) دریافتند که در مراتعی در اثر تلقیح صنوبر با قارچ گونه‌های بیگانه و پیشگیری از استقرار دوباره جامعه بومی Vogesgang و همکاران (Reeves *et al.*, 1990) دریافتند که در مراتعی در کالیفرنیا که مورد هجوم گیاهان بیگانه واقع شده بودند، نشانه‌های کاهش حضور کلونی‌های قارچ AM نسبت به مناطق مجاور دیده شوند (Reeves *et al.*, 1990). (Wirsel, 2004) یک مطالعه اکتوامیکوریز از بین برود (Kalmia angustifolia L.) بر روی صنوبر سیاه ممکن است در اثر تلقیح صنوبر با قارچ دیگر نشان داده که انتشار میکوریز می‌تواند ساختار سیستم ریشه‌ای گیاهان رقیب و توانایی آنها برای تولید آللوکمیکال‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (Li و Koide, 1991) (Li و Koide, 1991) گزارش داده‌اند که *Abutilon theophrasti* Medic. به تنهایی در میان آگشتگی پرسود قارچ‌های میکوریز رشد می‌کند؛ اما در حضور *Setaria lutescens* Hubb. اثرات مفید انتشار

- 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 globulus* 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 <sup>15</sup>N 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

## منابع:

- امیدپناه، ن.، ز. اسرار، و ع. مرادشاهی. ۱۳۹۰. بررسی پتانسیل آللوباتیک گیاه دارویی مورخوش بر رقم طلایه کلزا. *مجله زیست شناسی گیاهی*. سال سوم. ۱۰-۱.
- ابراهیمی کیا، ف. (۱۳۷۹) اثرات آللوباتیک 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 آللوباتیک کاه و کلش ارقام نخود سیاه بر جوانه‌زنی و رشد سورگوم، سویا و آفتابگردان. *مجله علوم کشاورزی ایران* ۳۴: ۶۲۴-۶۱۷.
- غدیری، ح. (۱۳۷۲) اصول و روش علم علف‌های هرز (ترجمه). انتشارات دانشگاه شیراز. ۲۵۶ صفحه.
- مسعودی خراسانی، ف.، غ. حدادچی، ن. باقرانی و م. بنایان اول. (۱۳۸۴) اثرات آللوباتیک 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: ۸۰-۷۳.
- 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.

- 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.
- Pendleton, 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 Pacllobutrazol 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.
- Wirsel, 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.